

**Strukturelle und biochemische  
Untersuchungen zu Ran und seinem  
Nukleotidaustauschfaktor RCC1**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Andreas Henkel**

aus Dortmund

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich der Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ angenommen.

1. Gutachter Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
2. Gutachter PD. Dr. Jürgen Kuhlmann

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_.







# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Nuklearer Transport	1
1.1.2	Ran Funktionen außerhalb der G1-Phase	11
1.1.3	GTP-bindende Proteine	12
<b>1.2</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>19</b>
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Proteine und Enzyme	19
2.1.3	Standards	19
2.1.4	Verbrauchsmaterial und Reagenzienkits	19
2.1.5	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	20
2.1.6	Säulenmaterialien	20
2.1.7	Bakterienstämme und Zelllinien	21
2.1.8	Nährmedien und Zellkulturmedien	21
2.1.9	Vektoren	22
2.1.10	Oligonukleotide	22
2.1.11	Peptide	23
2.1.12	Besondere Labor- und Meßgeräte	23
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.2	Expression und Isolierung von Proteinen	27
2.2.3	Biochemische und biophysikalische Methoden	32
2.2.4	Kristallographische Methoden	39
2.2.5	Zellkultur und Mikroinjektion	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
3.1.1	Kristallisationsansätze mit Ran·GDP und RCC1	43
3.1.2	Strukturanalyse des Ran·RCC1-Komplexes	44
3.1.3	Ran und RCC1 Mutanten	55
3.1.4	Biophysikalische Interaktionsmessung	60
3.1.5	Biologische Aktivität und Relevanz im Importmechanismus	86
3.1.6	Einfluss posttranslationaler Modifikation auf den Kernimport	98
3.1.7	Vorbereitende Entwicklung eines Signal-Peptid vermittelten Transportsystems	101
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>105</b>
4.1.1	Korrelation struktureller Veränderungen und Mutationsanalyse	107
4.1.2	Ein genereller Mechanismus	114

4.1.3	Ergänzende Daten zur Ran-RCC1-Interaktion	117
4.1.4	Regulation und Stabilität des Ran-GTP-Gradienten	120
4.1.5	Regulationsmöglichkeit über posttranslationale-Modifikation der NLS	123
4.1.6	MPS-NLS-vermittelter Import	125
<b>4.2</b>	<b>Ausblick</b>	<b>127</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>129</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>132</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>147</b>
<b>7.1</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	<b>147</b>
<b>7.2</b>	<b>Herleitungen</b>	<b>147</b>
7.2.1	Michaelis-Menten-Kinetik	147
<b>7.3</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>149</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>151</b>

# 1 EINLEITUNG

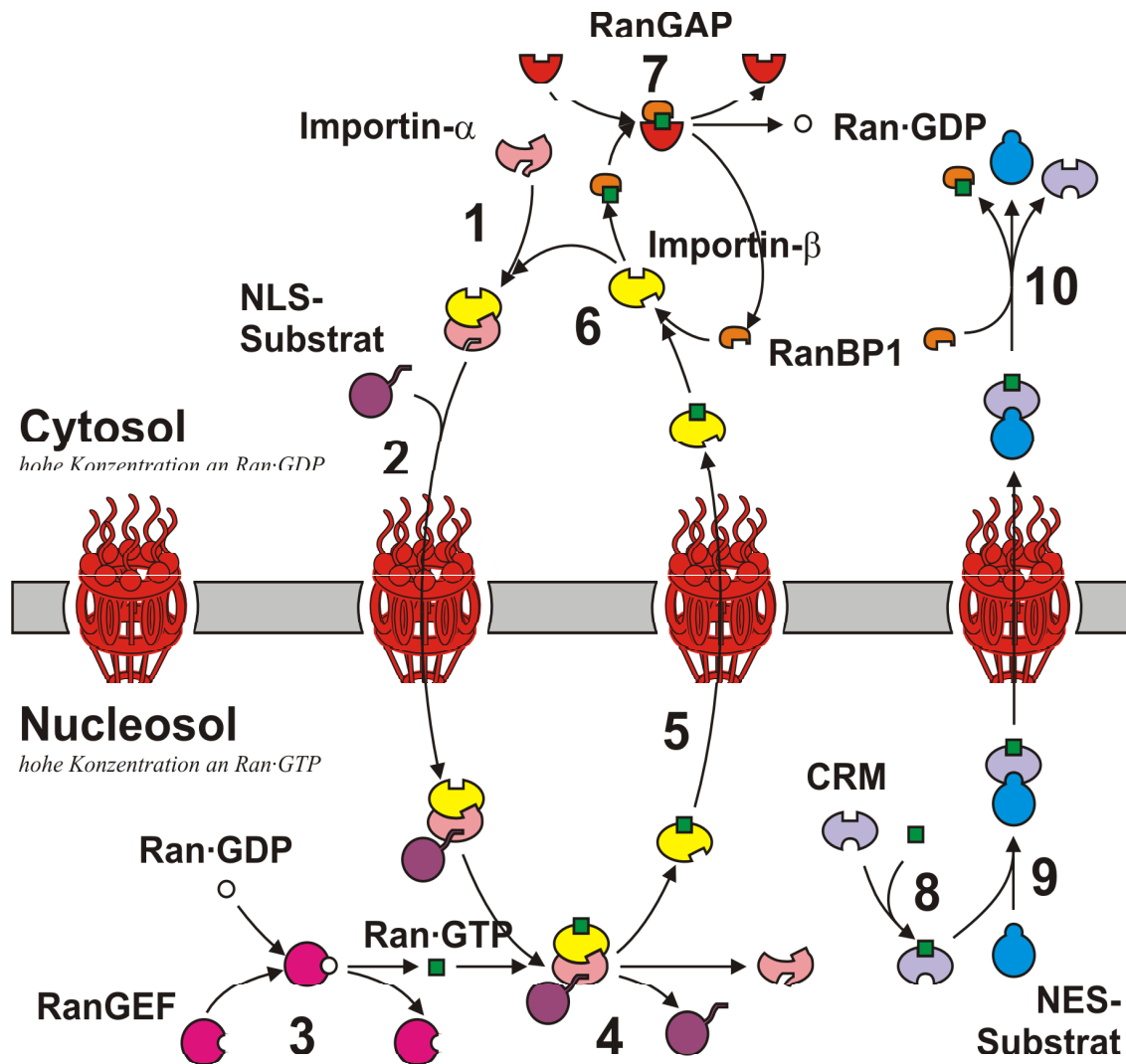
## 1.1.1. Nuklearer Transport

Eukaryoten unterscheiden sich von den Organismen des Reichs der Prokarya, den Prokaryoten, in vielerlei Hinsicht. Sie haben größere Ribosomen, sie besitzen z. T. Mitochondrien oder Chloroplasten, sie besitzen keine Plasmide, sie haben keine Zellwand und ihr Inneres ist in unterschiedliche Kompartimente unterteilt. Diese Kompartimente sind durch Lipiddoppelmembranen voneinander getrennt und bilden so unterschiedliche Reaktionsräume. Der Zellkern, umgeben von einer sich bis in das Cytoplasma erstreckenden Lipiddoppelmembran, die dort das Endoplasmatische Retikulum bildet, ist einer der bemerkenswertesten Reaktionsräume. Im Zellkern befindet sich die genomische DNA, die so im Gegensatz zur prokaryotischen DNA vom Cytoplasma getrennt vorliegt. Mit dieser räumlichen Trennung erwachsen Konsequenzen, die etwas zusätzliches erforderlich machen. Den Transport biologischer Makromoleküle (transfer RNA, ribosomale RNA, messenger RNA und nukleare Proteine wie Histonen und Transkriptionsfaktoren) durch eine Membran. Dieser Transport wird durch hochkomplexe Strukturen, den Kernporen (Nuclear Pore Complex, NPC) realisiert.

Die Bildung und Erhaltung einzelner Reaktionsräume und der Aufbau eines Transportsystems ist energetisch betrachtet ein sehr aufwendiger Prozess. Doch scheint sich die Separierung in Golgi, Endoplasmatisches Retikulum und Kern zu lohnen. Denn es ist bekannt, daß dieser Schritt einen wesentlichen Teil dazu beigetragen hat, daß Eukaryoten in der Lage sind hochkomplexe vielzellige Organismen zu bilden. Doch welche Gründe gibt es, die dafür sprechen ein solch aufwendiges kompartimentiertes System zu bilden und aufrecht zu erhalten? Die Einlagerung des Genoms in ein spezielles Organell unterstützt die generationsübergreifende Erhaltung der genetischen Stabilität; die Regulation zellulärer Schlüsselereignisse kann durch die Steuerung des Imports transkriptioneller Faktoren erreicht werden; die Trennung von Transkription und Translation eröffnet zusätzliche Regulationsmöglichkeiten wie silencing, alternatives splicing, die ein komplexeres Zellsystem oder Zellverbände erfordern; auch die Einlagerung nichtcodierender DNA innerhalb eines Gens in Form von Introns, die ein Prozessieren der RNA erforderlich machen, wird durch die räumliche Trennung von Transkription und Translation ermöglicht und erlaubt somit eine Erweiterung des DNA-Potentials.

Der Import und Export von Makromolekülen in den Kern ist ein streng regulierter Prozess, den das nukleare Transportsystem übernimmt. Schon 1975 war bekannt, daß es hierfür einen Mechanismus geben muss (Paine et al., 1975). Doch dauerte es eine ganze Weile, bis einer der Regulatoren entdeckt wurde. Am Anfang wurde TC4/Ran, das als Ras-homolog in einer cDNA-Bibliothek bekannt war (Drivas, 1990), als eine kleine GTPase zusammen mit seinem Nukleotidaustauschfaktor entdeckt (Bischoff und Postingel, 1991).

Im Lauf der Zeit wurden immer zahlreichere Faktoren identifiziert, die diesem Transportsystem zugeordnet werden konnten. Nach dem heutigen Stand sind schätzungsweise 100 bis 200 unterschiedliche, meist abundante Proteine involviert (Görllich und Kutay, 1999). Aus einem anfänglich simplen Modell entwickelte sich ein immer komplexer werdendes Transportsystem.



**Abbildung 1: Ran-abhängiger Import bzw. Export. Import:** Importin-alpha, Importin-beta und das Imports substrat bilden im Zytoplasma einen Komplex, wobei das Imports substrat von Importin-alpha an der Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear localization sequence*) erkannt wird (1+2). Dieser Komplex kann dann die Kernpore passieren (2). Aufgrund der Aktivität von RanGEF im Zellkern (3) ist die Konzentration an Ran-GTP im Kern hoch. So kann Importin-beta von Ran-GTP gebunden werden und der ternäre Komplex (4) dissoziiert. Der Importprozess des NLS-Substrats ist damit abgeschlossen. Importin-alpha wird durch einen speziellen Exportrezeptor dem Zyklus erneut zugeführt. Der binäre Komplex aus Importin-beta und Ran-GTP kann die Kernpore passieren (5). Im Zytoplasma wird er durch RanBP1-Bindung dissoziiert (6). Die hochaffine Bindung zwischen Ran-GTP und RanBP1 wird durch RanGAP-katalysierte GTP-Hydrolyse gelöst (7). **Export:** Der Exportrezeptor CRM geht mit Ran-GTP einen Komplex ein (8), der Substrate anhand eines NES-Motivs (NES, *nuclear export sequence*) bindet und die Kernpore passieren lässt (9). Im Zytoplasma wird der Komplex durch RanBP1 und RanGAP dissoziiert (10, analog zu 6 und 7) (Abbildung von M. Seewald).

Moleküle können zwar auch durch passive Diffusion in den Kern gelangen, doch wird die Diffusion ab einer bestimmten Größe sehr ineffizient (Bonner, 1978; Paine et al., 1975). Die Selektivität des Transports und damit folglich ein Signal vermittelter Transport konnte 1982 durch Dingwall (Dingwall et al., 1982) gezeigt werden. Dingwall verwendete in seinen Versuchen ein pentameres Nukleoplasmin, was unmittelbar nach der Injektion ins das Zytoplasma im Kern akkumulierte. Wurde das Protein vorher aber mit einer Protease behandelt, so daß letztlich nur ein proteaseresistenter Innenteil des Pentameres übrig blieb, verweilte es im Zytoplasma. Zwei Jahre später konnte das erste Importsignal im Simian Virus (SV) 40 T Antigen identifiziert werden. Die dort entdeckte Sequenz wurde dann als NLS (Nuclear Location Sequence) bezeichnet (Kalderon et al., 1984, Lanford und Butel, 1984). Die Notwendigkeit eines rezeptorvermittelten Imports konnte jedoch erst einige Jahre später gezeigt werden (Adam et al., 1990, Moore und Blobel, 1992). Es reichte also nicht allein ein Importsignal, um das Cargo durch die Kernpore zu transportieren. Vielmehr waren hierfür zusätzlich Bestandteile des Cytosols, so genannte Transportfaktoren notwendig.

Das Prinzip eines solchen rezeptorvermittelten Transports (s. Abbildung 1) besteht darin, daß Transportfaktoren auf der einen Seite der Kernmembran an ihre Zielproteine binden, sie durch die Kernpore auf die andere Seite bringen, dort freisetzen und letztlich wieder in das ursprüngliche Kompartiment zurück gelangen. So stehen sie dann für einen weiteren Transportprozess zur Verfügung. Da die Notwendigkeit des beiderseitigen Transports besteht, existieren Importine, die ihr Cargo im Zytoplasma binden und im Kern freisetzen und Exportine, die exakt auf die gegenläufige Art und Weise fungieren.

### **Import**

Proteine, deren Funktionsrelevanz im Zellkern liegt, besitzen eine NLS. Diese besteht aus einer fünf bis ca. 20 Aminosäuren langen, gering konservierten Abfolge basischer Aminosäuren, die von einem Adapterprotein erkannt wird (Adam, 1994, Görlich et al., 1994). Dies geschieht im Zytoplasma. Das NLS Zielprotein wird im Fall des Importin-beta/alpha abhängigen Kerntransports von dem Adapter Protein, dem Importin-alpha gebunden und bildet einen binären Komplex aus (Adam, 1994, Adam und Gerace, 1991). Dieser Cargo<sub>NLS</sub>-Importin-alpha-Komplex wird von Importin-beta (Adam, 1994, Chi et al., 1995, Görlich et al., 1995), dem Transportrezeptor, erkannt und gebunden. Importin-beta bindet an den nuklearen Kernkomplex und vermittelt dort die Translokation. Der ternäre Komplex gelangt dann durch die Kernpore in den Kern. Auf der Innenseite des Kernporenkomplexes greift dann das bereits oben beschriebene GTP-Bindungsprotein Ran in den Importprozess ein: In seiner GTP-gebundenen Form löst es den Import-Komplex von der Kernpore und bewirkt dessen Dissoziation in Importin-beta-Ran-GTP und Cargo<sub>NLS</sub>-Importin-alpha. Das Auflösen des Importin-alpha-Cargo<sub>NLS</sub>-Komplexes ist nicht geklärt.

## Export

Unter nuklearem Export versteht man den Transport von Makromolekülen aus dem Zellkern, wie z. B. von RNA (t RNA, r RNA, m RNA), ribosomale Bestandteile, Transkriptionsfaktoren, Proteinkinase u. a. . Neben solchen Substratmolekülen müssen aber auch die Importfaktoren wieder ins Cytosol zurückgebracht werden. Der beim Abschluss des Kernimports gebildete Importin-beta-Ran-GTP-Komplex z. B. kann die Kernpore ungehindert passieren und gelangt so wieder auf die zytoplasmatische Seite der Kernpore. Dort wird durch GTP-Hydrolyse unter dem Einfluss von RanGAP1, dem GTPase aktivierenden Protein von Ran (Becker et al., 1995; Bischhoff et al., 1995), und der Unterstützung von RanBP, ein Ran-Bindungs-Protein, der Komplex aus Importin-beta und Ran dissoziiert (Bischoff und Görlich, 1997).

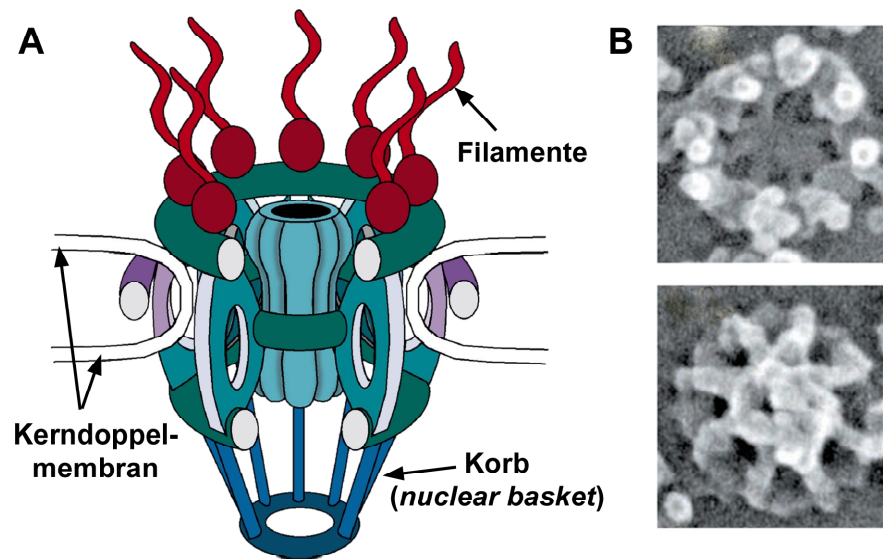
Um auch andere Transportfaktoren, die keine Ran-Bindungsstelle besitzen, wieder in das Zytoplasma zu transportieren und so für einen neuen Transportzyklus bereit zu stellen, werden Exportfaktoren benötigt. CAS ist der Exportfaktor von Importin-alpha (Kutay et al., 1997) und bindet bevorzugt an Importin-alpha Moleküle, die kein NLS-Imports substrat mehr gebunden haben. Zusammen mit dem an CAS gebundenen Ran-GTP wird es dann exportiert. Der Importin-alpha-CAS-Ran-GTP-Komplex kann nach Transport ins Zytoplasma, analog zu Importin-beta-Ran-GTP, an der Kernpore durch den Einfluss von RanGAP1 unter GTP-Hydrolyse aufgelöst werden. Importin-alpha steht so einem weiteren Importprozess zur Verfügung.

## Kernpore

Der Kernporenkomplex (NPC) ist eine komplexe makromolekulare Struktur, die aus Proteinen, den sogenannten Nukleoporinen (kurz Nups), aufgebaut wird. In der Hefe *S. cerevisiae* besteht der Porenkomplex aus etwa 30 Nukleoporinen und besitzt eine Masse von 66 MDa (Rout und Blobel, 1993; Stoffler et al., 1999; Rout et al., 2000). Die Anzahl der Nups in Vertebraten wird auf ca. 50 geschätzt (Fontoura et al., 1999). Die Gesamtmasse des Kernporenkomplexes wird auf etwa 125 MDa geschätzt (Reichelt et al., 1990). Ca. 65% der Hefenukleoporine haben entsprechende homologe Proteine in höheren eukaryotischen Zellen (siehe Doye und Hurt, 1997; Stoffler et al., 1999; Vasu und Forbes., 2001). Die Grundstruktur (s. Abbildung 2) ist in allen eukaryotischen Kernporen gleich (Yang et al., 1998). Der gesamte Kernporenkomplex besitzt eine achtfache Rotations-symmetrie.

Die Kernstruktur besteht aus den „Spokes“, welche in Speichenform auf der nukleären Seite über einen Ring verbunden sind und so den nukleären Korb bilden. Auf der zytoplasmatischen Seite befinden sich die Fibrillen, die ringförmig um die Kernpore angeordnet sind (Yang et al., 1998; Stoffler et al., 1999; Fahrenkrog et al., 2001). Das Zentrum bildet ein sogenannter zentraler Transporter in der Kernpore, der zur Zeit jedoch in seiner Funktion noch umstritten ist. Mit Hilfe mikroskopischer Methoden konnten zwar Proteine in diesem Bereich der Pore nachgewiesen werden (Yang et al., 1998; Stoffler et al., 1999),

doch ist hier nicht sicher, ob es sich um einen strukturellen Teil der Kernpore oder um Makromoleküle handelt, welche durch die Kernpore transportiert werden (Allen et al 2000, Fahrenkrog et al., 2001).



**Abbildung 2. Kernporenkomplex (NPC).** A) Schematische Darstellung des NPCs aus *S. cerevisiae*. (Seitenansicht modifiziert nach Blobel und Wozniak 2000 B) Ansicht des *X. laevis* NPCs aus dem Zytoplasma (oben) bzw. aus dem Nukleoplasma (unten) (Allen et al., 2000).

Die meisten Nukleoporine in *S. cerevisiae* konnten über genetische Analysen identifiziert werden (siehe Fabre und Hurt, 1997). Vervollständigt wurde die Liste der Nukleoporine durch die biochemische Aufreinigung von Kernporenkomplexen (Rout et al., 2000). In Übereinstimmung mit der strukturellen Symmetrie der Kernpore wurde gefunden, daß jedes der 30 Nukleoporine in 8-, 16- oder 32facher Kopienzahl pro Kernpore vorkommt. Die Kernporenproteine sind nicht nur die strukturellen Bausteine der Kernpore, sondern besitzen wichtige Funktionen bei der Translokation von Transportsubstraten. Hervorzuheben sind Nukleoporine, die eine sogenannte "FG-repeat"-Domäne besitzen. Diese Domäne enthält mehrere Wiederholungen der Aminosäuren Phenylalanin-Glycin (FG). Aufgrund der Interaktion dieser "FG-repeats" mit Transportfaktoren wird vermutet, daß diese Domänen die Bindungsstellen der Kernpore für die Transportfaktoren darstellen (Ryan und Went, 2002; Bayliss et al., 2002; Stewart et al., 2001; Rout und Aitchison, 2001). Die meisten Nups sind sowohl auf der nukleären als auch auf der zytoplasmatischen Seite der Pore zu finden (Rout et al., 2000). Eine Sonderstellung besitzen Nup159p, Nup42p, Nup60p und Nup1p (Rout et al., 2000). Diese exklusive Lokalisierung auf der nukleären oder zytoplasmatischen Seite der Kernpore ermöglicht eine Kontrolle der Transportrichtung (Beispiel hierfür ist Nup60p (Denning et al., 2001). Es gibt auch Hinweise, daß einzelne Nukleoporine dynamisch am Translokationsprozess teilnehmen (Beispiel hierfür ist Nup2p (Dilworth et al., 2001)). Die Kernporenkomplex selbst steht möglicherweise in direktem Kontakt mit nukleären Filamenten (Galy et al., 2000; Kosova et al., 2000) und dem Zytoskelett (Goldberg und Allen, 1995; Yan et al., 1997). Diese

Verbindungen können sowohl strukturell als auch für den nuklearen Transportprozess durch und insbesondere zur Kernpore eine bedeutende Rolle spielen.

### 1.1.1.1 Der Ran-GTP-Gradient

Eine zentrale Frage des nukleozytoplasmatischen Transportsystems betrifft seine Triebkraft. Energieunabhängige Transportsysteme sind nicht in der Lage, gegen einen bestehenden Gradienten zu arbeiten und würden daher lediglich ein Gleichgewicht zwischen Kern und Zytoplasma erzeugen. Die Akkumulation in einem der beiden Kompartimente würde allein von der Zahl der Bindungsstellen abhängen. Proteine mit einer DNA-Bindungsstelle würden sich so z. B. im Kern ansammeln. Anfänglich wurde diese Möglichkeit durchaus in Betracht gezogen (Paine, 1993). Heute weiß man, daß Transportrezeptoren ihre Zielproteine auch gegen einen chemischen Gradienten transportieren können. Dieser Transport wäre ohne metabolische Energie nicht möglich.

Untersuchungen zeigten, daß der NLS-vermittelte Import in der Abhängigkeit von Nukleotidtriphosphaten (NTP) stand (Newmeyer and Forbers, 1988, Newmeyer et al., 1986). Ohne diese energiereichen Verbindungen, stoppte der Transport im Bereich der Kernpore (Newmeyer and Forbers, 1988, Richardson et al., 1988). Daraufhin wurde der Transportzyklus in einen energieunabhängigen und energieabhängigen Teil gegliedert. Einige Jahre später wurde klar, daß Ran das energiekonsumierende Element war und das Ran in der Lage war, den Transportzyklus anzutreiben (Weis et al., 1996).

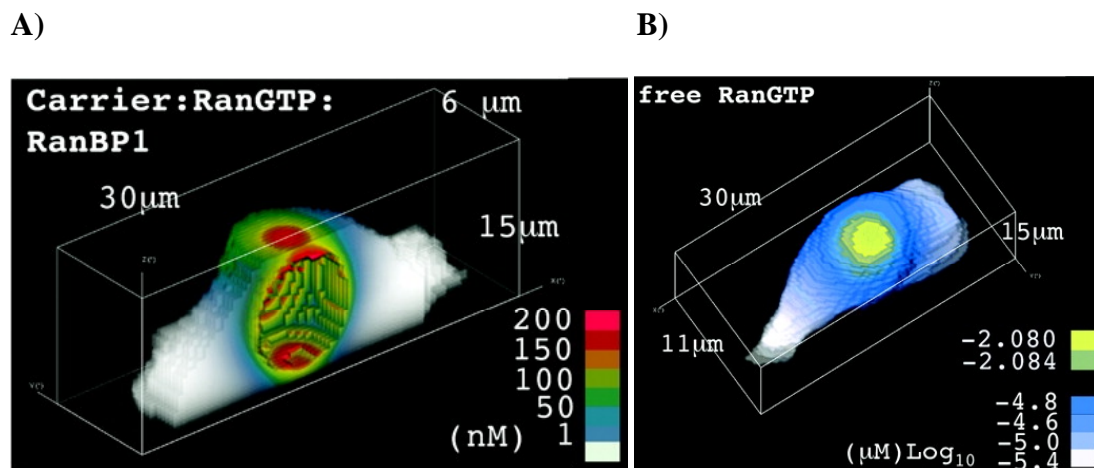
Überraschend war die Erkenntnis, daß nicht die Translokation durch die Kernpore von der GTP-gebundenen Form des Rans abhängig war, sondern die Auflösung des Cargo Rezeptorkomplexes (Englmeier et al., 1999, Ribbeck et al., 1999, Schwoebel et al., 1998). Die Auflösung des Komplexes wiederum ist allerdings nicht von der Hydrolyse des GTPs abhängig. Ribbeck stellte fest, daß der Nuclear-transport-factor-2 (NTF2) vermittelte Ran-Import zwar GTP benötigt, die Nukleotidhydrolyse im Kern jedoch nicht notwendig ist (Ribbeck et al., 1998). Auch der Export von tRNA oder Importin-alpha benötigt eine entsprechende Menge Ran-GTP, doch die Hydrolysereaktion ist auch hier nicht notwendig. Der Translokationsvorgang des Exportin-Cargo-Komplexes kann mittels GTPase-defizienten Ran Mutanten oder nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga durchgeführt werden (Englmeier et al., 1999). So konnte gezeigt werden, daß weder der Import noch der Export allein ein energiekonsumierender Prozess war. Bei dem Durchlaufen mehrerer Zyklen wurde jedoch Energie verbraucht. Es war die Auflösung des Komplexes aus Exportrezeptor und Ran-GTP, der durch die GTP-Hydrolyse Energie konsumiert (Görlich et al., 1996, Moore und Blobel, 1993). Dieser Umstand lieferte eine Erklärung der Energieabhängigkeit des multizyklischen Transports.

Wie wird jedoch die Energie genutzt, um dem Transportsystem eine gezielte Richtung des Transports zu geben? Energieabhängige Membrantransportsysteme für Substanzen geringer Masse nutzen oft das chemische Potential eines Gradienten. Der elektro-



chemische Gradient von  $\text{Na}^+$ -Ionen über die Plasmamembran wird zum Beispiel für die Aufnahme von Aminosäuren in Säugerzellen genutzt. Die  $\text{Na}^+$  Konzentration ist in der Zelle geringer als außen. Der Transport der Aminosäuren ist hier in Form eines Symports an den Natriumeinstrom gekoppelt.

In Analogie nutzt das nukleare Transportsystem ebenfalls ein chemisches Potential eines Gradienten, den Ran-GDP-Ran-GTP-Gradienten (s. Abbildung 3). Exportfaktor und Cargo werden zusammen mit Ran-GTP in Form eines Symports aus dem Kern transportiert. Importrezeptoren können als Antiporter gesehen werden, die Substrate gegen einen bestehenden chemischen Gradienten transportieren. Dies funktioniert, da nur die Dissoziation des Importkomplexes im Kern und nicht der Import selber Ran-GTP-abhängig ist.



**Abbildung 3. Ran-GTP-Verteilung.** Computer simulierte dreidimensionale Darstellung der „Steady-state“ Localisation A) des Carrier-RanGTP-RanBP1-Komplexes und B) des freien Ran-GTP's (Smith et al., 2002).

Die Erzeugung des Ran-GTP-Gradienten ist daher die Voraussetzung, um den kontinuierlichen Transport zwischen Kern und Zytoplasma und somit das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Entscheidend hierfür ist die Schalterfunktion von Ran als GTPase (s. u.) und die Verteilung seiner Regulatoren. Ran kann als GTPase in zwei Zuständen vorliegen, in der GTP- und in der GDP-Form. Liegt es im GTP-gebundenen Zustand vor kann das Nukleotid durch die intrinsische GTPase Funktion in Ran langsam, bzw. mit Hilfe des GTPase aktivierenden Proteins (GAP) von Ran (RanGAP; s.u.) etwa  $10^5$ fach beschleunigt in GDP und ein organisches Phosphat hydrolysiert werden (Bischoff et al., 1994; Klebe et al., 1995b). Die Überführung des GDP-gebundenen Zustandes in den GTP-gebundenen Zustand wird durch einen Nukleotidaustauschfaktor (Guanine Nucleotide Exchange Factor, GEF) katalysiert, der den Nukleotidaustausch ebenfalls um das  $10^5$ fache beschleunigt (Klebe et al., 1995b). Der entscheidende Punkt ist, daß beide Regulatoren in der Interphase räumlich voneinander getrennt sind. Das GTPase aktivierende Protein befindet sich im Zytoplasma, während der Nukleotidaustauschfaktor von Ran, RCC1 (Regulator of

Chromosome Condensation; s. u.) (Ohtsubo et al., 1987) chromatingebunden im Zellkern vorliegt (Seino et al., 1992). Seine Bindung an Chromatin ist noch weitestgehend ungeklärt, doch konnte gezeigt werden, daß es über die Histone H2A und H2B an das Chromatin gebunden wird. Durch diese Bindung verstärkt sich ebenfalls die Nukleotid-austauschaktivität an Ran (Nemergut et al., 2001). Das aus dem Kern gelangte Ran-GTP wird nach dem Eintritt in das Zytoplasma von seinem GAP erkannt und die Hydrolyse des Nukleotids bewirkt. Die Konzentration an Ran-GTP wird dadurch in diesem Kompartiment gering gehalten. Im Kern katalysiert das GEF die Nukleotidfreisetzung, so daß nur hier effizient Ran-GTP gebildet werden kann. Hierbei dürfte vor dem Hintergrund der relativen GDP-GTP-Konzentrationen in der Zelle bzw. der relativen Affinitäten von Ran gegenüber GDP und GTP im Kern höchstens die Hälfte des Ran-Proteins GTP-komplexiert vorliegen. So ist durch die Trennung von GAP und GEF die Konzentration an Ran-GTP im Kern höher als im Zytoplasma und die Bildung eines Gradienten gewährleistet.

## 2. Die gradientbildenden Faktoren

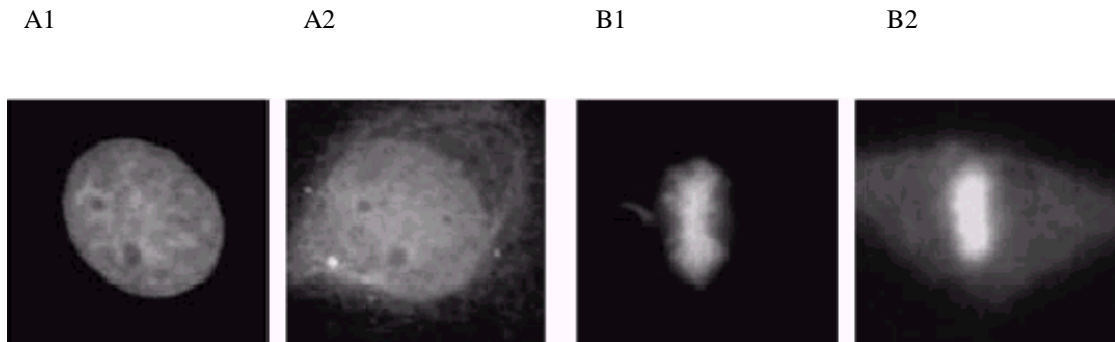
Für die Erhaltung eines Ran-GTP-Gradienten in Interphasezellen ist die räumliche Trennung der zwei wichtigsten Regulatoren von Ran essentiell. Es sind die für die kleinen Ras ähnlichen GTPasen typischen Regulatoren. Zum einen das GTPase aktivierende Protein (GTPase Activating Protein, GAP), das die intrinsische Hydrolysereaktion von Ran-GTP zu Ran-GDP und einem freien Phosphat beschleunigt. Zum anderen sein Nukleotid-austauschfaktor (Guanine Nucleotide Exchange Factor; GEF), der durch die Dissoziation des Nukleotides einen Nukleotidaustausch ermöglicht.

### RCC1

Wie bereits erwähnt, ist RCC1, der Regulator of Chromosom Condensation, das GEF von Ran. Er wurde als Protein entdeckt, das in der Lage ist, die temperatursensitive Hamsterzelllinie tsBN2 in ihrem Phänotyp zu komplementieren. Die thermosensitive Zelllinie durchläuft bei nicht Temperatur eine verfrühte Chromosomenkondensation oder verweilt in der G1 Phase des Zellzyklus (Ohtsubo et al., 1987). Homologe Proteine wurden in vielen Eukaryoten einschließlich der Hefen *S. pompe* und *S. cerevisias*. gefunden.

Mutationen in RCC1 betreffen das Prozessieren der pre-mRNA und deren Transport, das Einleiten der Mitose (Matsumoto und Beach, 1991) und die Chromosomenkondensation (Sazer und Nurse, 1994). Der Nachweis, daß RCC1 den Nukleotidaustausch an Ran-katalysiert (Bischoff et al., 1991), brachte die Verbindung zum Ran unterstützten nukleo-zytoplasmatischen Transport.

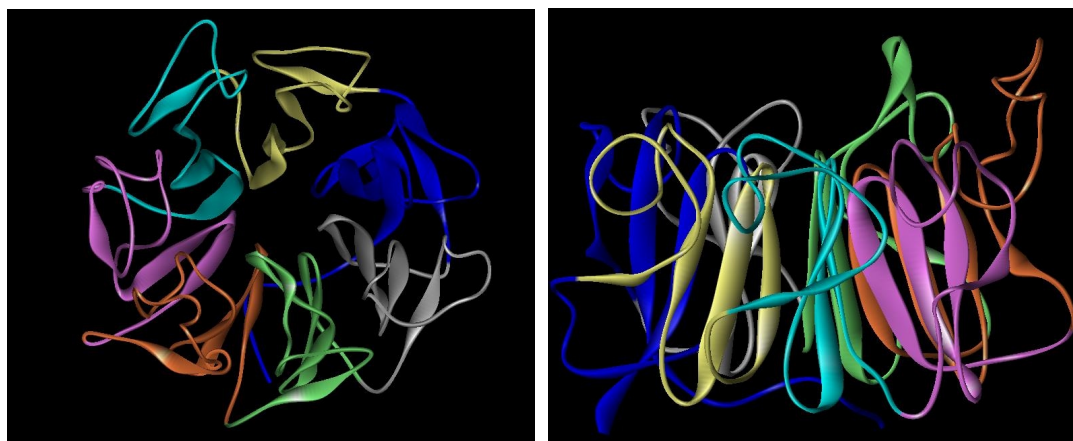
Wichtig für die Bildung des Ran-GTP Gradienten ist die Akkumulation des GEFs im Kern und sein Ausschluss aus dem Zytoplasma (s. Abbildung 4). Aufgrund mehrerer Importerkennungssignale (Nemergut et al., 2000) und seiner Eigenschaft, Chromatin binden zu können, liegt RCC1 in Interphasezellen nucleoplasmatisch vor.



**Abbildung 4 Lokalisation von RCC1 A) in der Interphase und B) während der Mitose.** Kolokalisation von RCC1 (A2 und B2) und DNA (A1 und B1) in Methanol/Aceton-fixierten HeLa-Zellen. RCC1 wurde über indirekte Immunofluoreszenz detektiert die DNA mit DAPI angefärbt (Moore et al., 2002).

Bei der Zellteilung bleibt RCC1 chromatingebunden (Seino et al., 1992, Yamada et al., 2001) und steht so nach dem Wiederaufbau der Kernhülle für die Bildung des Ran-GTP-Gradienten erneut zur Verfügung. Da RCC1 in den verschiedenen Phasen der Zellteilung chromatingebunden vorliegt und als RanGEF in seiner Umgebung eine erhöhte Ran-GTP Konzentration erzeugt (Kalab et al., 2002), gilt eine hohe Ran-GTP Konzentration als Marker für die Lokalisation des genetischen Materials (Hetzer et al., 2002).

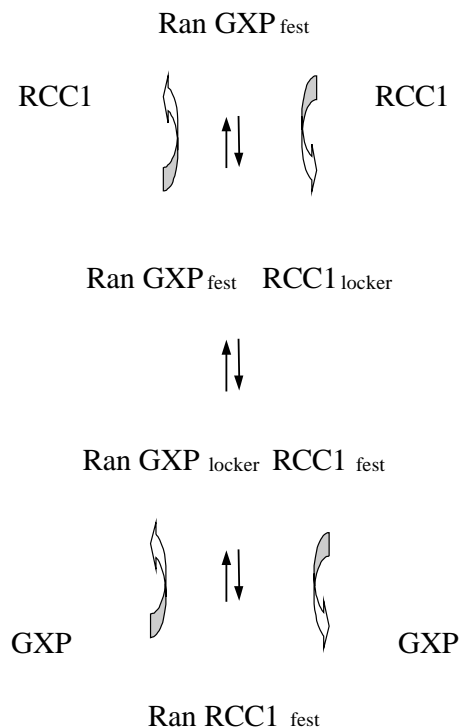
Die siebenblättrige RCC1-Porpellerstruktur (s. Abbildung 5) wurde 1998 von Louis Renault mit einer Auflösung von 1,7 Å gelöst (Renault et al., 1998). Jedes der sieben Blätter besteht aus 51-68 Aminosäuren. Die Ran Bindungsseite befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite der Chromatinbindungsseite.



**Abbildung 5: Röntgenkristallstruktur von RCC1.** Darstellung der RCC1-Porpellerstruktur in zwei Ansichten von oben (links) und seitlich (rechts). Die Blätterstrukturen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt: I = blau, II = grau, III = grün, IV = orange, V = lila, VI = hell blau und VII = gelb. Deutlich zu erkennen ist das aus der symmetrischen Struktur herausstehende extra-beta-Faltblatt (Renault et al., 1998).

Kinetische Untersuchungen konnten dazu beitragen, Geschwindigkeitskonstanten einzelner Reaktionsschritte zu ermitteln. Diesen Daten konnte entnommen werden, daß es nur geringe Unterschiede im differentiell RCC1-katalysierten Nukleotidaustausch an Ran gibt, womit deutlich wurde, daß zum einen keine präferenzielle Bindung von RCC1 an einen der zwei Ran Beladungszustände mit GDP oder GTP vorlag und zum anderen kein

Unterschied der Bindung von GDP oder GTP an den Ran-RCC1-Komplex. Die Beladung von Ran mit Nukleotid ist daher auf das Verhältniss von GDP/GTP im Kern zurückzuführen. Mit Hilfe dieser Daten war es möglich, ein Modell (s. Abbildung 6) zu entwickeln, welches die Reaktionsabfolge des RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschs beschreibt (Klebe et al., 1995).



**Abbildung 6: Modell des RCC1-katalysierten Nukleotidaustausches an Ran.** Dargestellt ist der Reaktionsablauf des reversiblen Nukleotidaustausches, der unabhängig vom Phosphorylierungszustand des Nukleotides (GXP= GDP oder GTP) abläuft. Nach der Bildung des ternären Komplexes kommt es zu einer Verlagerung der Affinitäten zwischen Ran, Nukleotid und RCC1.

Der RCC1-katalysierte Nukleotidaustausch an Ran verläuft nur dann im Sinne einer enzymatischen Reaktion, wenn ein Überschuß von freiem Nukleotid zur Verfügung steht. Der Mechanismus kann anhand eines für GDP und GTP symmetrischen Modells erklärt werden, bei dem es nach der Anlagerung von RCC1 zur Dissoziation des Nukleotids kommt und ein nukleotidfreier Komplex aus Ran und RCC1 gebildet wird. Die neue Anlagerung von freiem Nukleotid erfolgt dann unter Umkehrung der Reaktion. Zudem stellte sich heraus, daß der nukleotidfreie Komplex aus Ran und RCC1 in Abwesenheit von Nukleotid stabil ist (Klebe et al., 1995a; Wittinghofer, 1998), was die Annahme dieses Modells bekräftigte.

## GAP1

Ein Ran-GTPase aktivierendes Protein war lange vor Ran bekannt. Das *S. cerevisiae* Protein RNA1 wurde 1967, genau wie RCC1, als thermosensitive Mutante identifiziert (Hartwell et al., 1967). Seine Funktion machte man über den Phänotyp fest und brachte es mit einer gestörten RNA-Prozessierung in Verbindung. Die GTPase-aktivierende Eigenschaft des humanen RanGAP wurde erst 27 Jahre später von Bischoff (Bischoff et al., 1994) entdeckt. Daraufhin wurde gefolgert, daß es sich um das homologe RanGAP der Hefe handelt (Becker et al., 1995; Bischoff et al., 1995).

Der Vergleich mit verschiedenen Organismen zeigt, daß die GTPase aktivierenden Proteine zwei Bereiche gemein haben. Eine saure Region, deren Funktion unklar ist, und eine 330 bis 350 Aminosäuren lange Domäne mit Leucin-reichen Wiederholungen (LRR, leucine rich repeats). Sie stellt das minimale Motiv für die Aktivierung der GTPase-Funktion in Ran dar. Höhere Eukaryoten haben zusätzlich eine weitere Domäne, die eine Lokalisation am Kernporenkomplex bewirkt. In tierischen Zellen wird dieser Bereich als SUMO-attachment domain (SUMO-AD) bezeichnet (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996). Durch die Sumoylierung wird die Lokalisation eines Proteins verändert (Melchior, 2000). Im Fall des Maus RanGAPs wird durch diese Modifikation eine zytoplasmatische Orientierung am Kernporenkomplex durch die Bindung an RanBP2 erreicht (Matunis et al., 1998). Hierdurch wird ermöglicht, daß Ran-GTP unmittelbar am äußeren Teil der Kernpore abgefangen wird und die Aktivierung der GTPase zur Hydrolyse des Nukleotids erfolgt. RanGAP trägt auf diese Weise seinen Teil zur Gradientenerhaltung bei.

### 1.1.2 Ran Funktionen außerhalb der G1-Phase

Ran spielt neben der wichtigen Funktion im Nukleo-Zytoplasmatischen-Kerntransport eine vergleichbar essentielle Rolle bei der Regulation der Mikrotubulidynamik (Kalab et al., 1999; Fleig et al., 2000; Hetzer et al., 2000; Dasso et al., 2001). Zudem ist Ran gegen Ende der Zellteilung (Telophase) maßgeblich an der Neubildung der Kernhülle beteiligt (Kornbluth et al., 1994).

Trotz der Multifunktionalität von Ran, die sich über die verschiedenen Zellphasen erstreckt, bildet sich langsam ein verhältnismäßig simples Funktionsmodell heraus. Hierbei werden der Ran-unterstützte Kerntransport während der Interphase, die Spindelbildung und der Kernaufbau während der Zellteilung nicht durch den Wechsel der Interaktionspartner erreicht, sondern durch Veränderung der Lokalisation derselben regulatorischen Proteine in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus (Dasso, 2000; Hetzer et al., 2002; Melchior, 2001).

Es konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von Ran-GTP und RanGEF in metaphase-arretierten *X. laevis*-Extrakten die Bildung mitotischer Spindelfasern einleiten und fördern kann (Carazo-Salas et al., 1999; Ohba et al., 1999; Wilde und Zheng, 1999). Die Funktion von RanGAP in dieser Phase ist zur Zeit nur ansatzweise geklärt. Lokalisationsunter-

suchungen von RanGAP in HeLa-Zellen zeigen eine Orientierung in der Nähe der Spindelpole. Dies lässt im Zusammenhang mit der RanGEF Assoziation an den Chromosomen einen Ran-GTP Gradient vermuten, der sich von den Chromosomen bis hin zu den Spindelpolen erstreckt und so für die Ausrichtung der Spindelfasern und eine gerichtete Chromosomenbewegung relevant ist (Joseph et al., 2002).

In Bezug auf den Wiederaufbau des Kerns konnten Pseudonuklei in Abwesenheit von Chromatin gebildet werden. Hierzu wurden Ran-GDP beschichtete Kügelchen mit RanGEF, GTP und chromatin-freiem *X. laevis*-Extrakt zusammengegeben. Es bildeten sich kernmembranartige Strukturen an den Sepharosekügelchen (Zhang und Clarke, 2000). Hinweise dafür, daß für die Bildung der Kernhülle die RanGAP-katalysierte GTP-Hydrolyse notwendig ist und somit RanGAP in diesen Prozess involviert ist, gibt es seit längerer Zeit (Boman et al., 1992; Hetzer et al., 2000). Die Ran-GTP Hydrolyse unterstützt beispielsweise die Fusion von Vesikeln, die sich in der Telophase an das Chromatin anlagern und dort eine neue Kernhülle ausbilden (Hetzer et al., 2001).

### 1.1.3 GTP-bindende Proteine

GTP-bindende Proteine spielen eine wichtige regulatorische Rolle in fundamentalen Prozessen wie der Regulation der Signaltransduktion, der ribosomalen Proteinbiosynthese, des intrazellulären Transports von Proteinen und RNA, der Organisation des Cytoskeletts, der Endo- und Exocytose und des vesikulären Transports (Bourne, 1990). GTP-bindende Proteine lassen sich in fünf Superfamilien einteilen: die alpha-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine ( $G\alpha$ ), die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3), die großen GTP-bindenden Proteine (Dynamamin, Mx, GBP), die Signalerkennungspartikel und deren Rezeptor (SRP, SRP-R) und die Familie der Ras-homologen kleinen GTPasen (Ras, Ran, Rab etc.).

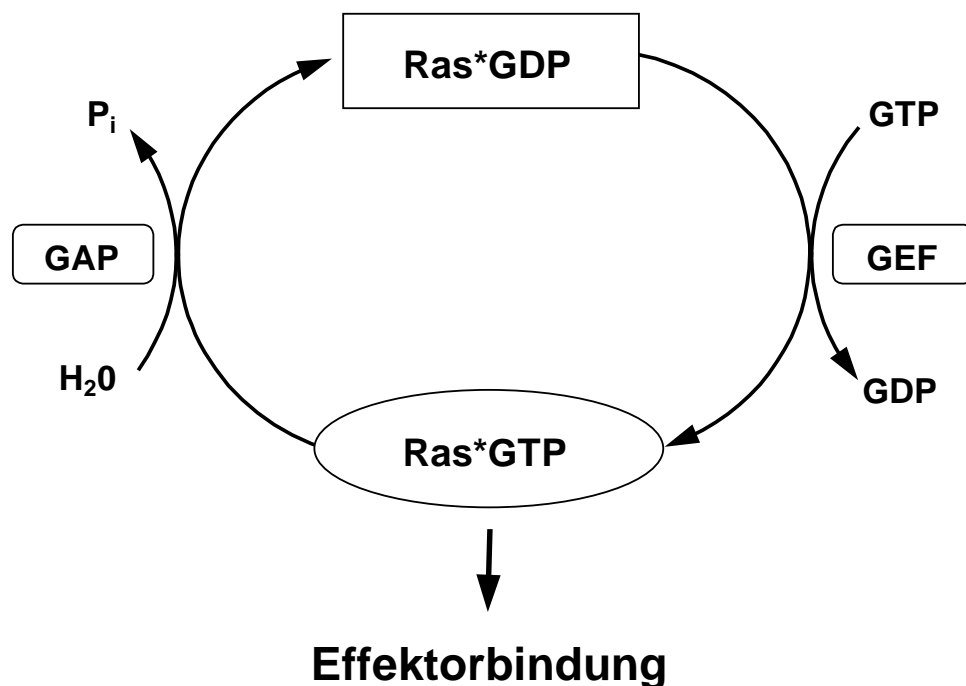
Gemeinsames Merkmal dieser Proteine ist die  $Mg^{2+}$ -abhängige Bindung von Guaninnukleotiden mit Affinitäten im mikromolaren bis picomolaren Bereich und die Fähigkeit zur Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Phosphat. Die dreidimensionale Struktur einiger Vertreter der GTP-bindenden Proteine konnte durch Röntgen-Kristallographie aufgeklärt werden: Ras (Pai et al., 1989; Milburn et al., 1990), Ran (Scheffzek et al., 1995), RhoA (Wei et al., 1997), Rac1 (Hirshberg et al., 1997), Rab3A (Ostermeier & Brunner, 1999), Arf-1 (Amor et al., 1994; Greasley et al., 1995), EF-Tu (La Cour et al., 1985; Berchtold et al., 1993), EF-G (Czworkowski et al., 1994), Transducin (Noel et al., 1993),  $G_i$  alpha (Coleman et al., 1994), FtsY (Montoya et al., 1997) und hGBP1 (Prakash et al., 2000). Sie zeigen, daß die Nukleotidbindung in strukturell ähnlichen „G-Domänen“ erfolgt (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Konsensusmotiv der G-Domänen**

	<b>G1</b> P-Schleife	<b>G2</b> Switch-I	<b>G3</b> Switch-II	<b>G4</b>	<b>G5</b>
Ras	<b>GAGGVGKS</b>	T	<b>DTAGQ</b>	<b>NKCD</b>	<b>Y IETSA K</b>
Ran	<b>GDGGTGKT</b>	T	<b>DTAGQ</b>	<b>NKVD</b>	<b>Y YEISA K</b>
ARF	<b>GLGAAGKT</b>	T	<b>DVGGQ</b>	<b>NKQD</b>	<b>F QETSA L</b>
Ga	<b>GAGESGKS</b>	T	<b>DVGGQ</b>	<b>NKKD</b>	
EF-Tu	<b>GHVDHGKS</b>	T	<b>DCPGQ</b>	<b>NKCD</b>	
SRP	<b>GLQGSGKS</b>	T	<b>DTSGQ</b>	<b>NKLD</b>	
Konsensus	<b>GXXXXGKS/T</b>	T	<b>DXXGQ</b>	<b>T/NKXD</b>	<b>F/Y XEXSA K/L</b>

GNBPs: Guaninnukleotid-bindendes Proteine. x= beliebige Aminosäure. Andere Aminosäuren sind im Einbuchstabencode gekennzeichnet. Fett markierte Aminosäuren kennzeichnen stark konservierte Bereiche.

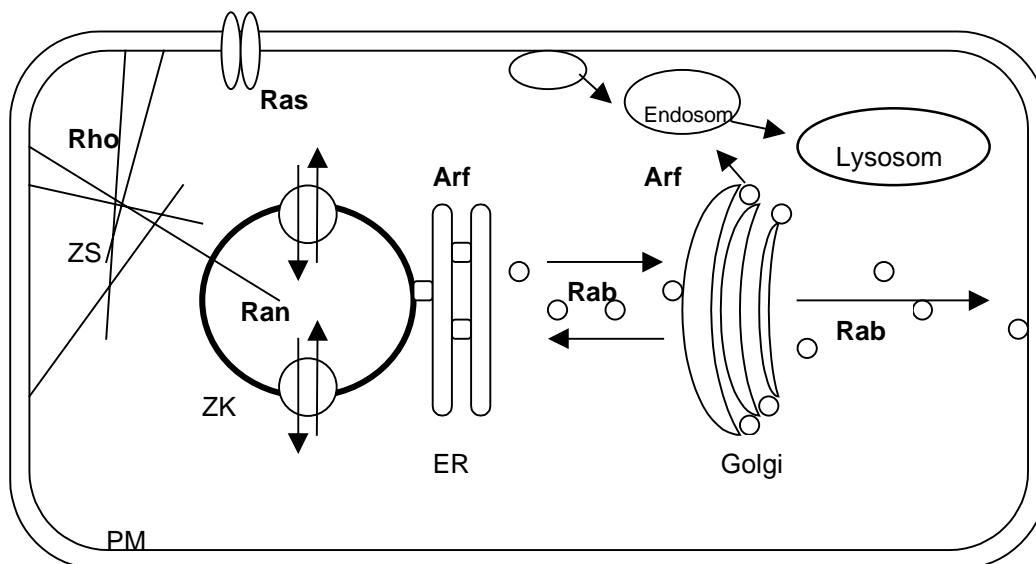
Die Proteinkonformation unterscheidet sich bei Bindung von GDP oder GTP und ist eine Grundlage biologischer Aktivität der GTP-bindenden Proteine. In den meisten Fällen ist die GTP-gebundene Form durch Bindung an andere Effektorproteine biologisch aktiv, während die GDP-gebundene Form inaktiv ist. Den GTP-bindenden Proteinen kommt somit die Funktion als molekularer Schalter innerhalb der Zelle zu (s. Abbildung 7).



**Abbildung 7: Ras als molekularer Schalter.** Durch Guanosinnukleotid-Austauschfaktoren (GEF:guanine nucleotide exchange factor) erfolgt die Aktivierung von Ras durch Bindung von GTP. Ras-GTP kann Effektorproteine binden. Die Inaktivierung von Ras wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAP: GTPase activating protein) vermittelt, welche die Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Phosphat katalysieren.

### 1.1.3.1 Die Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen

Durch Sequenzvergleiche konnten mittlerweile acht Unterfamilien Ras-homologer Proteine identifiziert werden, die aufgrund ihrer Größe von 20 bis 30 kDa auch kleine GTPasen genannt werden. Zu den Ras-Proteinen gehören neben den drei Isoformen H-, N-, M- und K-Ras auch R-Ras, TC21, Rheb und die Rap1/2- und RalA/B-Proteine (Bos, 1997). Die Proteine der Rho-Familie sind an der Organisation des Aktincytoskeletts beteiligt (Mackay & Hall, 1998). Sie induzieren die Bildung von Streßfasern und fokalen Kontakten (Rho), Membranausstülpungen und Lamellipodien (Rac) und Filopodien (Cdc42). Die mehr als 40 bekannten Rab-Proteine sind am vesikulären Transport beteiligt (Schimmöller et al., 1998), ebenso wie die Arf-Proteine (Moss & Vaughan, 1998). Die Funktionen der Rad-, Rheb- und Rit-Proteine sind noch nicht im Detail geklärt. Eine wichtige Rolle bei der Regulation des Kerntransports spielt Ran (Moore, 1998).



**Abbildung 8: Zelluläre Funktion der Ran-ähnlichen GTPasen.** Schematische Darstellung der funktionellen Lokalisierung Ras-ähnlicher Proteine in der Zelle. PM: Plasmamembran, ZS: Zytoskelett, ZK: Zellkern, ER: Endoplasmatisches Retikulum, Golgi: Golgi-Apparat

### 1.1.3.2 Ran, die nukleare GTPase aus der Ras-Superfamilie

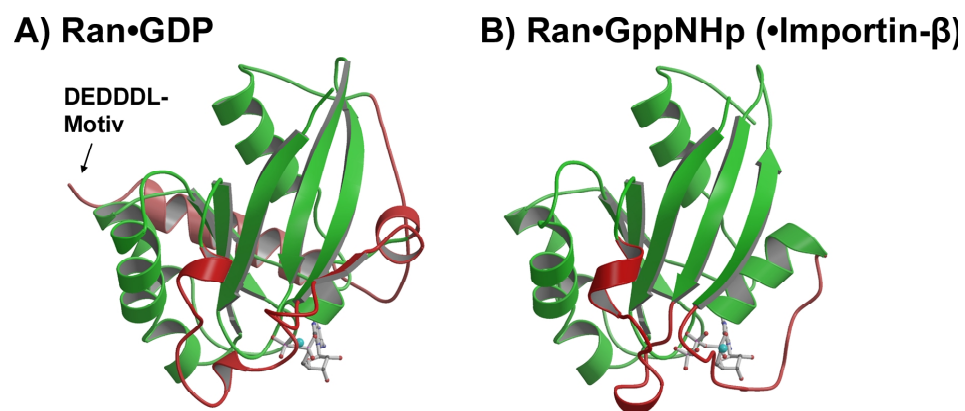
Ran ist die einzige GTPase der Ras-Superfamilie, die im Kern zu finden ist und zwischen diesen Kompartimenten hin und her pendelt. Wie bereits erwähnt, ist sie an der Regulation des Zellzyklus, der Neubildung der Kernhülle während der Zellteilung und der Regulation der Mikrotubulidynamik beteiligt (Kalab et al., 1999; Fleig et al., 2000; Hetzer et al., 2000; Zhang et al., 2001). Aufgrund ihrer starken Einbindung in derart essentielle zelluläre Mechanismen sind Veränderungen oder Störungen an Ran zwangsläufig Ursache verschiedener Erkrankungen.

Ran ist ein wichtiges Schlüsselement in der Mitose und wirkt als mitotischer Spindelcheckpoint. Dieser Checkpoint ist oft in Tumoren viralen Ursprungs wie Brust-,



hepatischen und Dickdarm Tumoren gestört (Behrens et al., 2001), wobei die Bedeutung von Ran in dieser Hinsicht unbekannt ist. In anderen Fällen konnte gezeigt werden, daß Ran in Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Krankheiten, die durch Exotoxine Gram-positiver Bakterien erzeugt werden, involviert ist (Daniel et al., 2001). Bislang am umfassendsten untersucht ist jedoch die Rolle von Ran beim nukleo-zytoplasmatischen Transport von Makromolekülen durch die nuklearen Kernporen.

1995 wurde die Kristallstruktur von Ran durch Klaus Scheffzek (s. Abbildung 9) in der GDP-gebundenen Form gelöst. Da Ran zur Ras-Superfamilie gehört, besitzt es die hierfür spezifischen Merkmale. Ran ist in der Lage, mit Hilfe von Magnesium GTP zu binden und kann dieses in GDP und Phosphat hydrolysieren. Die hierfür relevanten strukturellen und katalytischen Elemente sind in der G-Domäne lokalisiert.



**Abbildung 9: Vergleich der Röntgenkristallstruktur von Ran-GDP und Ran-GppNHp.** A) Ran-GDP (Scheffzek et al., 1995) B) Ran-GppNHp Importin-beta (Vetter et al., 1999a) oder mit RanBP1

Im Unterschied zu anderen GTPasen wird Ran nicht am C-Terminus posttranslational modifiziert. Daher kann es keine Membranbindung eingehen. Ran hat zudem eine lang ausgehende C-terminale Schleife mit einem konservierten DEDDDL-Motiv am Ende. Diese Schleife besteht aus einer alpha-Helix, die durch 16 Aminosäurereste vom restlichen Teil des Proteins getrennt ist. Biochemische (Richards et al., 1995; Hieda et al., 1999) und strukturelle Untersuchungen (Vetter et al., 1999a; Vetter et al., 1999b; Chook and Blobel, 1999) haben gezeigt, daß das C-terminale Ende in der Ran-GTP Form ungebunden und frei beweglich ist.

Die G-Domäne von Ran ist der von Ras sehr ähnlich. In ihr sind die charakteristischen Eigenschaften für die Nukleotid- und Magnesiumbindung lokalisiert. Sie besteht aus fünf parallelen beta-Faltblatt-Strängen (beta-1, beta-3 bis beta-6) und einem antiparallelen Strang (beta-2), die von fünf alpha-Helices (alpha-1, alpha-5) umgeben sind. Die Stränge sind durch Schleifen (Loops, L1-L10) miteinander verbunden. Die G-Domäne von Ran hat zusätzlich zwei kurze Faltblattstränge (beta-2<sup>E</sup>, beta-7), die parallel zu beta-1 und beta-3- beta-6 verlaufen, sowie eine 5-gängige alpha-Helix-6.

Die G-Domäne bildet den nukleotidbindenden Bereich, in dem G1 die Phosphatbindung und die Magnesiumbindung und G4 und G5 die Bindung des Guanosins übernehmen. Für die Schalterfunktion oder generell die Unterscheidung des GTP und GDP gebundenen Zustandes sind zusätzlich zum C-Terminus die Switch-Regionen von großer Bedeutung. Sie zeigen beispielsweise in den GDP-Strukturen eine andere Flexibilität, als in den GTP-gebundenen Strukturen. In Ran wird die Nomenklatur von Ras übernommen, so daß es Switch-I und Switch-II gibt. Beide enthalten einen Teil der G-Domäne. Switch-I erstreckt sich von F 26 bis P 49. Switch-I ist weiter vom Magnesium und Nukleotid entfernt als bei Ras, da Helix-alpha-1, nach der zweiten Windung durch einen Knick unterbrochen ist und Switch-I so eine andere Orientierung bekommt. Switch-II erstreckt sich von der Aminosäure 65 bis 76 und ist an der Bindung des Magnesiums beteiligt. Switch-I und II werden generell als die sogenannten Schalterregionen innerhalb Ras-homologer GNBPs (Guanosinnukleotid-bindende Proteine) Proteine bezeichnet, die durch Wechselwirkung mit dem hochkonservierten Glycin (Pos. 68 in Ran; 60 in Ras) und Threonin (Pos. 42 in Ran; 35 in Ras) als Sensor auf das Vorhandensein des gamma-Phosphats dienen. Sie sind mitverantwortlich für Konformationsänderungen nach der Hydrolyse bzw. der Aktivierung durch erneute GTP-Bindung (Pai et al.,1990).

## 1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Untersuchung der Röntgenkristallstruktur von Guanosinnukleotid-bindenden Proteinen im Komplex mit ihrem jeweiligen Nukleotidaustauschfaktor haben im Fall von EF-TS·EF-TU, Sos1-Ras, Sec7·Arf1 und Tiam1·Rac wichtige Informationen über den Mechanismus der Nukleotidfreisetzung geliefert. Für Ran waren vergleichbare Informationen über einen Ran·RCC1-Komplex nicht verfügbar. Daher sollte die Lösung der Kristallstruktur dieses Proteinkomplexes unterstützt werden.

Der Mechanismus der katalytischen Nukleotidaustauschreaktion stellte eine zentrale Frage dar. Zu Beginn dieser Arbeit lagen kinetische Informationen vor, die die Reversibilität der Reaktion und die Affinität der einzelnen Reaktanten zueinander beschrieben. Weitere biochemische Daten beschrieben ein Modell, in dem die Bindungsorientierung von Ran und RCC1 deutlich wurde. Daten die den Vorgang der Nukleotidfreisetzung beschreiben, lagen nicht vor. Aus einer strukturellen Analyse des Ran·RCC1-Komplexes sollten daher Aminosäurereste determiniert werden, die Aufschluß über den katalytischen Mechanismus der Nukleotidaustauschreaktion geben. Durch die Herstellung von Mutanten und die kinetische Analyse sollte dann die Bedeutung dieser Aminosäurereste festgestellt werden.

Biophysikalische Untersuchungen zur Dynamik der Austauschreaktion von Wildtyp-Proteinen und ausgewählten Mutanten liefern zunächst Informationen zur Rolle einzelner funktioneller Elemente der beteiligten Makromoleküle unter den Bedingungen von *in vitro*-Systemen. Uns interessierte darüber hinaus die Korrelation dieser Befunde mit dem Verhalten der entsprechenden Konstrukte in einem zellbiologischen Kontext. Ein Vergleich dieser Daten sollte einen Einblick in die Stabilität des Ran·GTP-Gradientensystems und die Bedeutung dieser Interaktion für die Zelle verschaffen.

Weiterhin war es von Interesse dem von Klebe (Klebe et al., 1995a) erstellten kinetischen Modell der Ran·RCC1-Interaktion Informationen zu ergänzen. Einzelne Parameter konnten in vorangegangenen Arbeiten nicht direkt ermittelt werden oder wurden theoretisch berechnet. Aus diesem Grund sollte eine auf SPR-basierende Methode etabliert werden, die es erlaubt die kinetische Parameter der Assoziation von RCC1 an den binären Komplex aus Ran und Nukleotid und der Dissoziation von Ran und RCC1 zu ermitteln.

Durch die Etablierung zellbiologischer Methoden zur direkten Verfolgung des Transports von Imports substraten in den Nukleus ergab sich im Verlauf der Arbeit darüber hinaus die Möglichkeit zusätzliche Fragestellungen zur Erkennung spezifischer NLS-Merkmale (nuclear localization sequence) und den MPS (membrane penetrating sequence) NLS vermittelten Import zu untersuchen.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von einer der Firmen Aldrich (Steinheim), Amersham-Pharmacia (Freiburg), Applichem (Darmstadt), Baker (Deventer, Niederlande), Fluka (Neu-Ulm), GERBU (Gaiberg), Merck (Darmstadt), Pharma-Waldhof (Düsseldorf), Qiagen (Hilden), Riedel-de-Haen (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in jeweils höchster Reinheit bezogen.

#### 2.1.2 Proteine und Enzyme

Dnase I	Roche (Mannheim)
Glucuronidase	Roche (Mannheim)
Pfu-DNA-Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)
Proteasen	Sigma (Deisenhofen)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach)
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen (Hilden)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Schwalbach)
Alkalische Phosphatase	Boehringer (Mannheim)
BSA	Fluka (Neu-Ulm)
Anti-GST-Antikörper	BIAcore (Uppsala, Schweden)

#### 2.1.3 Standards

##### DNA-Standards

1 kB Marker	Life Technologies/GibcoBRL (Eggenstein)
$\lambda$ -Marker	New England Biolabs (Schwalbach)

##### Proteinstandards

SDS6 (205, 116, 97, 66, 45, 29 kDa)	Sigma (Deisenhofen)
SDS7 (66, 45, 36, 29, 24, 20.1, 14.2 kDa)	Sigma (Deisenhofen)

#### 2.1.4 Verbrauchsmaterial und Reagenzienkits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Amsterdam, Niederlande) (Braman et al., 1996)
dGTP BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Langen)

Bradfordlösung	BioRad (München)
CM5-Sensorchip	BIACore (Uppsala, Schweden)
Microcon-Ultrazentrifugationseinheiten	Millipore (Hamburg)
Mikropipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Mowiol	Calbiochem (Bad Soden)
Vivaspin-Ultrafiltrationseinheiten	Vivascience (USA)
Zellkulturschalen (2.5 ml)	Corning (New York, USA)
Zellkulturschalen Falcon (10 ml, 5 ml)	Becton Dickinson (Plymouth, UK)

### 2.1.5 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

5 x SDS-Probenpuffer	150 mM Tris/HCl, pH 6.8, 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0.01 % (w/v) Bromphenolblau, 10 mM DTE
6 x DNA-Probenpuffer	0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerol
Biacore-Laufpuffer	10 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.0005 % Igpal
Entfärbelösung für SDS-Gele	20 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Ethanol
Färbelösung für SDS-Gele	0.1 % Coomassie Brilliant Blue G250, 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R250, 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
HPA-Biacore-Laufpuffer	10 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
PBS	10.2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA

### 2.1.6 Säulenmaterialien

C-18 Ultrasphere	Beckmann (Unterschleißheim)
DEAE-Sepharose Fast Flow	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Fractogel EMD SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Merck (Darmstadt)
Glutathion Sepharose 4B	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Superdex 75 und 200	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
HiTrap Gelfiltrationssäule	Amersham Pharmacia (Freiburg)

### 2.1.7 Bakterienstämme und Zelllinien

*E. coli*-Stämme (Stratagene):

<i>Escherichia coli</i> CK600K	SupE, hsdM <sup>+</sup> , hsdR <sup>-</sup> , kan <sup>R</sup>
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal, dcm, (DE3)
<i>Escherichia coli</i> TG1	Δ lac-pro, thi-1, supE, hsdD5, [F' traD36, proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> , lacZΔM15]
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , endA1, hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ/lacZ/lacZYargF/U196, φ80ΔlacZΔM15, k <sup>-</sup>

Eukaryontische Zelllinien:

HeLa	Epithelartige Zellen der Patientin, H. Lacks	ATCC JCRB9004
BHK21	Embryonale, kontaktinhibierte Mauszellen	ATCC CCL-10

### 2.1.8 Nährmedien und Zellkulturmedien

*E. coli* Medien:

LB-Medium:	1% (w/v) Bacto-Trypton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 0.25 % (v/v) 2 M NaOH
	Für Agarplatten zusätzlich 2 % (w/v) Bacto Agar

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem Medium Ampicillin oder Kanamycin zugegeben. Die Nährmedien und Platten wurden von der Zentralen Einheit Mikrobiologie/Biotechnologie hergestellt.

Zellkulturmedien:

Medium 199 mit Earle's Salzen
DMEM (+ 0.11 g/l Na-Pyruvat, + Pyridoxin)
DMEM (+Na-Pyruvat, + 1000 g/l Glucose, + Pyridoxin)
Fötales Kälberserum (FCS)
Natriumpyruvat MEM 100 mM
L-Glutamin 200 mM 29,2 mg/ml
Nichtessentielle Aminosäuren Lösung 100x (ohne L-Glutamin)
Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)
Trypsin/EDTA

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Life Technologies/GibcoBRL (Eggenstein) bezogen.

### 2.1.9 Vektoren

pET3D	Novagen (Schwalbach)
pET3D Ran f. l.	Dr. Becker, MPI, Dortmund
pGEX4T3	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
pGEX4T3 Ran f. l.	Dr. Assheuer, MPI, Dortmund
ptac RCC1	Dr. Klebe, MPI, Dortmund

Antibiotika wurden von GERBU (Gaiberg) bezogen und den Medien nach dem Sterilisieren zugesetzt.

### 2.1.10 Oligonukleotide

RanV45I:

5'-GTATGTAGCCACCTTGGGTATTGAGGTTTCATCCCCTAGT-3'

RanK99A:

5'-GATGTAACATCGAGAGTTACTTACGCTAATGTGCCTAACTGGCATAGAG-3'

RanW104:

5'-GTTACTTACAAGAATGTGCCTAACGCTCATAGAGATCTGGTACGAG-3'

RanK123A:

5'-CCCATTGTGTTGTGTGGCAACGCTGTGGATATTAAGGACAGGAAAGTG-3'

RanD125A:

5'-GTGTTGTGTGGCAACAAAGTGGCTATTAAGGACAGGAAAGTGAAGGCG-3'

RanK130A

RCC1D95A:

5'-CTATTCCTTCGGCTGCAATGCTGAGGGTGCCCTGGGAAGGGAC-3'

RCC1N149:

5'-CTCTGGGGCTCCTTCCGGGACGCTAACGGTATTGGACTGTTG-3'

RCC1d148d151:

5'-GTGTCTTCCTCTGGGGCTCCTTCCGGAATAACGTGATTGGACTGTTGGAGCC  
CATGA-3'

RCC1E200A:

5'-CTCTACACCTTGGGCTGCGGGGCACAGGGCCAGCTAGGCCGTGTGC-3'

RCC1Q201A:

5'-CTACACCTTGGGCTGCGGGGAAGCGGGCCAGCTAGGCCGTGTGCCTG-3'

RCC1R217A:

5'-GAGTTATTTGCCAACCGTGGTGGCGCGCAAGGCCTCGAACGACTCCTG-3'



### 2.1.11 Peptide

Bezeichnung	Sequenz	Molekulargewicht (Da)	Hersteller
v-Jun NLS	SKS RKRKLGG	1392	Dr. Norman Kuder
phosphorylierte v-Jun NLS	SKS <sup>P</sup> RKRKLGG	1472	Dr. Norman Kuder
glykosylierte v-Jun NLS	SKS <sup>G</sup> RKRKLGG	1595	Dr. Norman Kuder
Myristoylierte-MPS-NLS	(Myr) GARASVLLGGGKKKKKK (Fluo)	2212	Dr. Timo Krämer

Sequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. <sup>P</sup> = PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, <sup>G</sup> = Glukoserest, MPS = membrane penetrating sequence aus dem HIV-1-Matrixproteins gag MA; NLS = nuclear localization sequence aus dem Maus-Protein c-Abl, Fluo = Fluorescein, Myr = Myristoylrest. Die Hersteller sind bzw. waren Mitglieder der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Herbert Waldmann, Institut für Organische Chemie der Universität Dortmund.

### 2.1.12 Besondere Labor- und Meßgeräte

FluoroMax II Spektrofluorimeter	SPEX Instruments S. A., Inc. (NJ, USA)
FPLC, GradiFrac-System	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
konfokales Mikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar)
Kapillarenpuller	Bachhofer (Reutlingen)
M-110S Microfluidizer Processor	Microfluidics (USA)
Mikroinjektionssystem AIS	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop Axiovert 135TV	Zeiss (Oberkochen)
Oberflächenplasmonresonanzgerät	
BIAcore™ 1000	BIAcore (Uppsala, Schweden)
Stopped-Flow-Gerät SX.18MV	Applied Photophysics (Leatherhead, UK)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden ca. 4 ml einer Übernachtskultur verwendet. Die Präparation erfolgte mit den Plasmid Mini- und Midi-Prep Kitsystemen der Fa. Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Isolierung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Fällung der Proteine durch Kalium-Dodecylsulfat. Die Plasmid-DNA wird aus dem Überstand der Fällung mittels Anionenaustauscherchromatographie gereinigt.

#### 2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Analytische und präparative Trennungen von DNA-Fragmenten erfolgten mit horizontaler Gelelektrophorese. Je nach Größe der Fragmente wurden 0,8 bis 1,6 %ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer für analytische Trennungen benutzt. Die DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit 20 % (v/v) Probenpuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau und 40 % (w/v) Saccharose in wässriger Lösung) versetzt. Je nach Größe der Fragmente dienten 80-160 ng des 1 kB Markers/ $\lambda$ -DNA als Standard. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 6 V pro Zentimeter Elektrodenabstand. Zur Färbung wurde das Gel für ca. 10 min in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid gelegt und anschließend gewaschen. Die Dokumentation der Banden erfolgte mit Hilfe eines UV-Illuminators (Anregung bei 302 nm).

Zur Isolation von DNA aus Gelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers Qiagen (Hilden) verwendet. Dabei wird die Agarose zunächst bei 50 °C aufgelöst und die DNA dann über eine Anionenaustauschersäule gereinigt.

#### 2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion können DNA-Fragmente *in vitro* selektiv amplifiziert werden (Mullis & Faloona, 1987). Ein 100  $\mu$ l Ansatz besteht aus: 1  $\mu$ l 100  $\mu$ M 5'-Primer, 1  $\mu$ l 100  $\mu$ M 3'-Primer, 10  $\mu$ l dNTP-Lösung (je 1 mM), 10  $\mu$ l 10x PCR-Puffer, 0,05-0,1  $\mu$ g Template und 1  $\mu$ l Polymerase. Das Standard-PCR-Programm bestand aus 25 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 96 °C, 45 s Hybridisierung bei 55 °C und 30 bis 150 s Elongation bei 72 °C sowie einer anfänglichen Denaturierung bei 96 °C für 60 s und einer abschließenden Elongation bei 72 °C für 4 min.

Die Hybridisierungstemperatur wurde anhand der Denaturierungstemperatur  $T_m$  den verwendeten Primern angepasst:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 0,41 \cdot (\% \text{ GC-Gehalt}) - 675 / (\% \text{ Fehlpaarungen})$$

Gleichung 1

Nach Ablauf des PCR-Programms wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C oder -20 °C aufbewahrt. Abhängig davon ob eine präparative oder analytische PCR angestrebt war, wurde Pfu-Polymerase von Clontech (Heidelberg) oder Taq-Polymerase von Qiagen (Hilden) im jeweiligen Puffer des Herstellers eingesetzt.

Für die Präparation von PCR-Produkten wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers Qiagen (Hilden) verwendet. Das Verfahren beruht auf der Verwendung einer Anionenaustauschersäule zur Trennung von Edukten und Produkt.

Zur Identifikation positiver *E. coli*-Klone im Anschluss an eine Transformation wurde die Kolonie-PCR angewandt. Anstelle der Template-DNA wurden Zellen eingesetzt. Das Primer-Paar wurde so gewählt, dass die Produktgröße bzw. die Bildung von PCR-Produkt positive Klone identifiziert.

#### **2.2.1.4 Ortsspezifische Mutagenese**

Zum gerichteten Austausch einzelner Aminosäuren auf DNA-Ebene wurde das Quik-change Protokoll von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) angewendet. Diese Methode beruht auf einer PCR-Amplifizierung von zirkulärer Plasmid-DNA aus *E. coli* mit einem mutagenen Primerpaar. Das erhaltene PCR-Produkt ist im Unterschied zur Template-DNA unmethyliert und kann daher im Anschluss mit der methylierungsabhängigen Restriktionsendonuklease DpnI im Ansatz angereichert werden (Kunkel, 1985). Nach der Restriktion wurden die Ansätze in *E. coli* TG1 transformiert und Klone sequenziert.

#### **2.2.1.5 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Spaltung doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Fa. New England Biolabs (Schwalbach) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Zur Hydrolyse mit zwei Enzymen wurde die Reaktion gleichzeitig durchgeführt, sofern die Bedingung identisch oder ähnlich war. Andernfalls wurde die Hydrolyse sequentiell durchgeführt.

#### **2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA erfolgte unter Verwendung des Enzyms T4-DNA-Ligase der Fa. Roche (Mannheim). Vektor- und Insert-DNA wurden etwa im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligation wurde in einem Endvolumen von 20 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase im Puffer des Herstellers durchgeführt.

#### **2.2.1.7 Transformation von *E. coli*-Zellen mit zirkulärer DNA**

Zur Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernacht-Kultur des *E. coli*-Stammes angeimpft, bei 37 °C in Gegenwart des benötigten Antibiotikums geschüttelt und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C pelletiert

(1200 g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden in 200 ml eiskalter 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen, 30 min auf Eis aufbewahrt und erneut zentrifugiert. Zuletzt wurden die Zellen in 20 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung, 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, zu je 200 µl aliquotiert, 30 min auf Eis gelagert und bei -70 °C schockgefroren.

Zur Transformation wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit 2-100 µl DNA-Lösung (5-50 ng DNA) gemischt und dann für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeimpuls von 42 °C für 90 s ausgesetzt, 2 min auf Eis inkubiert und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Um plasmidkodierte Resistenzen wirksam werden zu lassen, wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C geschüttelt und dann auf Selektivmedium ausplattiert.

#### 2.2.1.8 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten generell nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977; Sanger und Coulson, 1975). Die Methode beruht auf dem „Cycle-Sequencing“-Verfahren nach der „BigDye“-Terminator-Methode mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden und AmpliTaq-Polymerase FS (Applied Biosystems, Langen). Ein Sequenzierungsansatz beinhaltete ca. 0.5 µg Plasmid-DNA, 5 pmol Oligonukleotid und 4 µl Terminatormix (BigDye Terminator Kit) in 20 µl Gesamtvolumen. Das PCR-Programm bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 96 °C für 30 s und durchlief dann 25-mal einen Zyklus aus Denaturierung (30 s 96 °C), Hybridisierung (15 s 50 °C) und Elongation (4 min 60 °C). Abschließend wurde das Produkt durch eine Ethanol-fällung gereinigt. Dazu wurden zu 20 µl PCR-Produkt 1 µl Dextranblau, 2 µl 3 M NaAc, pH 4.3, und 50 µl 100 % Ethanol gegeben und die Lösung durch Zentrifugation präzipitiert (10000 g, RT, 30 min). Nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Pellet kurz getrocknet. Die Analyse der Sequenzierungsprodukte erfolgte zentral nach der Methode der Kapillarelektrophorese in einem ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Langen).

#### 2.2.1.9 Konstrukte

Ran aus *Homo sapiens* (AS 1-213) in pET3D  
 RCC1d1-19 aus *Homo sapiens* (AS 20-421) in pTAC (Dr. Renault, MPI, Dortmund)  
 RanBP1 aus *Homo sapiens* (AS 1-201) in pGEX  
 Importin-beta aus *Homo sapiens* (AS 1-462) pET3D

#### 2.2.1.10 Punktmutanten

Ran T24N, V45I, E70A, F72A, K99A, W104, K130A, C112S/V45C, C112S/S94C  
 RCC1 N149A, d148d151, E200A, Q201A, R217A

## 2.2.2 Expression und Isolierung von Proteinen

### 2.2.2.1 Expressionstests

Nach Transformation des Expressionsvektors in *E. coli* wurden mehrere Einzelklone selektiert, die in analytischen Ansätzen auf ihre Fähigkeit zur Überexpression getestet wurden. Dabei wurden 50 ml LB-Medium mit 0.5 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln bei 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5-0.8 kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,1-0.5 mM IPTG. Das Zellpellet einer 100 µl Probe vor Induktion bzw. 50 µl nach 3 bzw. 16ständiger Expression wurde der Kultur entnommen und anschließend einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen.

Waren die genauen Bedingungen für ein Expressionsplasmid noch nicht bekannt, so wurden Parameter variiert, wie die Temperatur, die optische Dichte, bei der induziert wurde, die IPTG-Konzentration und die Dauer der Überexpression.

### 2.2.2.2 Überexpression

Die Expression der unterschiedlichen Konstrukte wurde mit folgenden Rahmenparametern durchgeführt:

**Tabelle 2: Expressionsbedingungen**

Plasmid	<i>E. coli</i> Stamm	Medium	Antibiotikum	Induktion bei OD <sub>600</sub>	[IPTG] in mM	T in °C	Dauer der Expression
pET3D- Ran	BL21 DE3	LB	100 µg/ml Amp	0,7	0,2	20	18 h
pGEX <sub>4</sub> T <sub>3</sub> Ran	BL21 DE3	LB	100 µg/ml Amp	0,7	0,1	20	18 h
pTAC RCC1	CK600K	LB	70 µg/ml Amp 40 µg/ml Kan	0,7	0,5	20	18 h

Vor Induktion durch IPTG wurden die Kulturen bei 37°C inkubiert. Amp = Ampicillin; Kan = Kanamycin; IPTG = Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid

Nach der Expression wurden die Zellen zentrifugiert (6000 g; 4 °C; 15 min), in Puffer resuspendiert und vor dem Einfrieren wieder zentrifugiert (6000 g; 4 °C; 15 min) oder direkt für die Aufreinigung verwendet.

### 2.2.2.3 Zellaufschluß mit dem *Microfluidizer*

Eine besonders effiziente mechanische Methode des Zellaufschlusses bietet der *Microfluidizer* (Microfluidics, USA). Die Zellsuspension wird aus einem Vorratsgefäß angesaugt, in zwei Ströme geteilt und mit einem Druck von 600 bar in einer Reaktionskammer wieder zusammengeschossen. Durch eine metallene Kühlspirale und den geringen Durchmesser der Röhren ist eine effiziente Kühlung im Eisbad gewährleistet.

Das Bakterienpellet wurde im jeweiligen Aufschlußpuffer unter Zusatz von PMSF (100 µM Endkonzentration) als Proteaseinhibitor resuspendiert. Der *Microfluidizer* wurde zunächst mit Eis gekühlt und mit Aufschlußpuffer äquilibriert. Die Zellsuspension wurde

dann zwei bis drei mal mit 600 bar aufgeschlossen. Schließlich wurde der Aufschluß mit DNaseI behandelt und abzentrifugiert.

#### **2.2.2.4 Ammoniumsulfatfällung**

In wäßrigen Lösungen besitzen Proteine eine Hydrathülle. Gibt man hohe Konzentrationen an Ammoniumsulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) zu einer Proteinlösung werden alle Wassermoleküle zur Hydratation des Ammoniumsulfats benötigt. Es bildet sich ein Proteinpräzipitat. Dieses Phänomen kann man zur Konzentrierung und zur Trennung von Proteinen nutzen, da verschiedene Proteine bei unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumsulfat ausfallen.

Zur Konzentrierung wurde einer Proteinlösung unter Rühren auf Eis gemörstertes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 3 M portionsweise innerhalb etwa einer Stunde zugegeben. Das gebildete Proteinpräzipitat konnte für weitere Reinigungsschritte bei 4°C gelagert werden, oder wurde bei 75.000 x g und 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert.

#### **2.2.2.5 DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie**

Durch die Ionenaustausch-Chromatographie werden Moleküle aufgrund ihrer Ladung getrennt. Bei der Anionenaustausch-Chromatographie binden negativ geladene Moleküle an das positiv geladene Säulenmaterial (z. B. DEAE-Sepharose, Diethylamminoethyl-Sepharose, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Durch Zugabe von KCl verdrängt das Chloridion die Proteine von ihren Bindestellen. Der isoelektrische Punkt des zu reinigenden Proteins ist entscheidend für die Auswahl des Säulenmaterials.

Für die chromatographische Reinigung von Proteinen wurde eine Niederdruckanlage (GradiFrac-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) benutzt. Der nach dem Aufschluß erhaltene lösliche Überstand wurde auf eine mit 2 Volumen Aufschlußpuffer (ohne PMSF) äquilibrierte DEAE-Säule aufgetragen. Danach wurde mit 2 Volumen Puffer nachgespült. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl über 5 Säulenvolumen eluiert und fraktioniert gesammelt. Die Regeneration der Säule erfolgte mit 1 Volumen 3 M KCl.

#### **2.2.2.6 Gelfiltration**

Durch die Gelfiltration oder Größenausschlußchromatographie werden Proteine nach ihrer Größe getrennt. Das Säulenmaterial besitzt mikroskopisch kleine Poren. Große Proteine passieren das Säulenmaterial, ohne in die Poren hineindiffundieren zu können. Sie werden im sogenannten Ausschlußvolumen eluiert. Kleine Proteine verteilen sich durch Diffusion in die Poren in einem größeren Volumen und zeigen dadurch ein verzögertes Laufverhalten.

Präparative Gelfiltrationen wurden mit einer 60 cm langen Säule mit einem Durchmesser von 26 mm, gefüllt mit Superdex 75 bzw. 200 Säulenmaterial (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), bei einer Flußrate von 2 ml/min durchgeführt. Von dem

Proteingemisch wurden maximal 150 mg in einem Volumen von 3 ml aufgetragen. Die getrennten Proteine wurden fraktioniert gesammelt.

#### **2.2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Analyse der Reinheit von Proteinen wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli angewandt (Laemmli, 1970). Die verwendeten Polyacrylamidgele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Trenngel bestand aus 15 % (w/v) Acrylamid, 375 mM Tris-HCl, pH 8.8, und 0.4 % SDS, das Sammelgel aus 3.9% Acrylamid, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, und 0.4 % SDS. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat und 0,075 % (w/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) gestartet. Nach dem Start der Polymerisation des Trenngels wurde die Lösung in die Gießapparatur gefüllt und mit Ethanol überschichtet. Ca. 20 min später wurde das Sammelgel gegossen.

Die Proteinproben wurden mit 5x Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50 % Glycerin, 10 % SDS, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0.01 % Bromphenolblau) versetzt, 2 min bei 100 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA pro Gel. Anschließend wurde das Gel für 2 min in 90 °C heißer Coomassielösung (40 % (v/v) Ethanol, 0.3 % Coomassie Blue G250 und 0.3 % Coomassie Blue R250 in ddH<sub>2</sub>O) gefärbt und für etwa 2 min in 90 °C heißer Entfärbelösung (10 % (v/v) Ethanol und 20 % (v/v) in ddH<sub>2</sub>O) entfärbt.

#### **2.2.2.8 Austausch Protein-gebundener Nukleotide**

##### **Ras·mGDP (EDTA-Methode)**

GTP-bindende Proteine benötigen für eine hoch-affine Nukleotidbindung in der Regel Mg<sup>2+</sup>-Kationen. Durch Zugabe von EDTA kann die Konzentration an freiem Mg<sup>2+</sup> in der Lösung soweit verringert werden, dass die Proteine das Nukleotid weniger affin binden und das Nukleotid schnell mit der umgebenden Lösung austauschen. Arbeitet man mit einem hohen Überschuss an mGDP, lässt sich Protein-gebundenes GDP sehr effizient zu mGDP austauschen. In einem typischen Ansatz werden 150  $\mu$ M Ran·GDP zusammen mit 100 mM Ammoniumsulfat, 15 mM EDTA, 5 mM DTE und 10 mM GTP inkubiert (3 h bei 4 °C). Anschließend wird die Nukleotidbindung durch Zugabe von 20 mM MgCl<sub>2</sub> wieder gestärkt und der Puffer mittels Vivaspin15-Konzentratoren gewechselt.

##### **Ran·GppNHp (EDTA / Alkalische Phosphatase)**

Für den Austausch mit Guanosin-5'-( $\beta$ , $\gamma$ -imido)triphosphate (GppNHp) wurde in jedem Fall die EDTA-Methode angewendet. Durch den Einsatz von Alkalischer Phosphatase, die freies GDP in der Lösung abbaut und damit dem Austauschgleichgewicht entzieht wurde die Austauscheffizienz gesteigert (Lenzen et al., 1998).

### 2.2.2.9 Isolierung von Proteinkomplexen

Zur Isolierung des binären Proteinkomplexes aus Ran, bzw. RanT24N und RCC1 wurden beide Proteine in einem 1,4 zu 1 Verhältnis in einem  $\text{KPO}_4$ -Puffer (pH 6,5), 25 mM Ammoniumsulfat, 10 mM EDTA und 3 mM DTE zusammengegeben und für 5 min bei 4°C inkubiert. Der sich dabei gebildete Komplex wurde durch eine Gelfiltration (Superdex 75) gereinigt und mit Hilfe eines SDS-Gels identifiziert und vereinigt. Die erhaltene Lösung wurde mit Vivaspin15-Konzentratoren (ca. 10 kDa Ausschlussgröße) konzentriert und in Aliquots schockgefroren.

#### 2.2.2.10 Analyse von Nukleotiden mittels *reversed phase* HPLC

Die Analyse der Nukleotidbeladung GTP-bindender Proteine erfolgte mittels isokratischer HPLC unter Ionenpaarbedingungen. Dem Puffer wurde dazu Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) zugegeben. Je höher die Ladung des Nukleotids ist, desto mehr TBAB bindet es. Durch TBAB-Bindung erhöht sich die Hydrophobizität und damit die Retentionszeit, so daß höher geladene Nukleotide später eluieren. Die Proben wurden auf C18-Ultrasphere-Material in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 6.8, 10 mM TBAB, 0.2 mM  $\text{NaN}_3$  mit 7.5 % (v/v) Acetonitril in wässriger Lösung bei 1.8 ml/min getrennt. Der Verlauf der Elution wurde bei 254 nm verfolgt und Peaks automatisch integriert (C-R6A-Chromatopac Integrator, Shimadzu). Über den Vergleich der Retentionszeiten und der Peakfläche mit Nukleotidlösungen bekannter Konzentration wurden die Menge und die Art der Nukleotide ermittelt (Lenzen et al., 1995; Tucker et al., 1986).

#### 2.2.2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

Coomassie Brilliant Blue-G250 bindet an Proteine und verändert dabei sein Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm. Dieser Umstand lässt sich zur Proteinbestimmung ausnutzen (Bradford, 1976). Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Sensitivität; es werden nur 1 bis 20 µg/ml Protein benötigt. Zugleich ist aber die Bindung des Farbstoffs abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit der Proteine und die Methode daher für genaue Proteinbestimmungen empirisch zu kalibrieren.



### 2.2.2.12 Absorptionsspektroskopie

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden wurde an einem Uvikon 933 Zweistrahl-photometer (Kontron, Neufahrn) in 1 cm Schwarzwandküvetten durchgeführt. Generell liegt diesen Messungen das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde:

$$A_x = \varepsilon_x \cdot c \cdot d$$

$A_x$ : Absorption bei einer Wellenlänge  $\lambda = x$  nm

$\varepsilon_x$ : molarer Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge von  $\lambda = x$  nm

$c$ : Konzentration

$d$ : Schichtdicke der absorbierenden Lösung

Als Extinktionskoeffizient für Guaninnukleotide wurde ein Wert von  $13\,700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  angenommen (Voet et al., 1963).

Gleichung 2

### 2.2.2.13 Modifikation von Proteinen mit exponierten Cystein-Seitenketten

Proteine mit Oberflächen-exponierten Cystein-Seitenketten eignen sich zur Modifikation mit Haloacetamiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Ran-Protein an einem Cystein-Rest mit Hilfe von 1,5-IAEDANS (5-(((2-Iodoacetyl) amino) ethyl) amino) naphthalin-1-Sulfonsäure) modifiziert. Die Fluoreszenzeigenschaften dieses Fluorophors ändern sich in Abhängigkeit der Umgebung und können somit als Indikator für Proteinbindung bzw. Konformationsänderungen dienen.

Vor der Reaktion mit dem 1,5-IAEDANS müssen störende Thiolreagenzien entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde das Protein in Vivaspin15-Konzentratoren in Standardpuffer P mit 2 mM Ascorbat anstelle von 2 mM DTE überführt. Für die Markierungsreaktion wurde das Protein auf ca. 100  $\mu\text{M}$  verdünnt und mit 2 bis 5fachem Überschuss an 1,5-IAEDANS versetzt. Die Reaktion wurde für ca. 12 h bei 4 °C ausgeführt und anschließend durch Pufferwechsel mit Standardpuffer P gestoppt. Die erhaltenen Produkte wurden mittels Massenspektroskopie geprüft. (Die in dieser Arbeit verwendeten 1,5-IAEDANS markierten Ran C112S/V45C, C112S/S94C-Konstrukte wurden freundlicherweise von Michael Seewald zur Verfügung gestellt.)

### 2.2.2.14 Massenspektroskopie

Wurden neu klonierte Proteinkonstrukte das erste Mal isoliert, so wurden diese im Massenspektrometer untersucht. Ein  $\mu\text{l}$  einer salzfreien Proteinlösung (ca. 100  $\mu\text{M}$ ) wurde in einer Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor: 2, 10, 50 und 100) mit Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure) vermischt und auf einer Maldi-Platte getrocknet. Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einer Voyager BioSpectrometry<sup>TM</sup> Workstation und

einer Voyager-DE Pro BioSpectrometry™ Workstation (PerSeptive Biosystems) aufgenommen.

Das Masse-Ladungsverhältniss eines Ions ist proportional zum Quadrat seiner durchschnittlichen Flugzeit.

$$M/z = 2t^2 K/L^2$$

t	=	Flugzeit
L	=	Flugstrecke
m	=	Masse
K	=	kinetische Energie des Ions
z	=	Anzahl der Ladungen des Ions

Gleichung 3

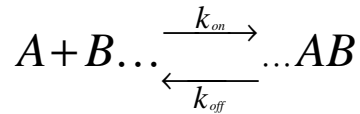
## 2.2.3 Biochemische und biophysikalische Methoden

### 2.2.3.1 Auf Fluoreszenz basierende Meßmethoden

Ein durch Licht angeregtes Molekül kann auf unterschiedliche Weise in seinen energetischen Grundzustand zurückkehren. Es kann seine Energie in Form von Wärme oder von Licht emittieren (Lottspeich & Zorbas, 1998). Bei letzterem unterscheidet man die Phosphoreszenz und die Fluoreszenz. Die Fluoreszenz ist im Vergleich zur Phosphoreszenz durch einen wesentlich schnelleren Übergang in den Grundzustand ( $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  s) gekennzeichnet. Die Energie des emittierten Photons ist immer geringer als die des bei der Anregung des Fluorophors absorbierten Photons. Das Spektrum der Fluoreszenz ist daher gegenüber dem Spektrum der Absorption zu größeren Wellenlängen verschoben (Rotverschiebung). Durch Fluoreszenzlöschung (Quenching) kann Energie von einem Fluorophor auf Nachbarmoleküle übertragen werden, wodurch die Intensität der Fluoreszenz (Quantenausbeute) verringert wird. Dieses Phänomen wurde in dieser Arbeit bei Messungen mit fluoreszierenden mant-Nukleotiden (N-Methylantraniloyl-) ausgenutzt. Bei der Bindung von mGDP an Ran-Proteine erhöht sich die Quantenausbeute des mant-Fluorophors durch den Wechsel aus der hydrophilen Umgebung des Puffers in eine hydrophobe Umgebung des Proteins (John *et al.*, 1990).

**Bestimmung von  $k_{on}$  und  $k_{off}$  über  $k_{obs}$** 

Die reversible Assoziation zweier Moleküle A und B wird durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben:



Gleichung 4

Für die Geschwindigkeit, mit der sich nach Mischen von A und B der Komplex AB bildet, gilt:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{on} \times [A] \times [B] - k_{off} \times [AB]$$

[A] bzw. [B]: Konzentration von A bzw. B

$k_{on}$ : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation

$k_{off}$ : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation.

Gleichung 5

Wird die Komponente A in großem Überschuß eingesetzt, so bleibt ihre Konzentration während der gesamten Assoziationsreaktion näherungsweise konstant. Die Bildung des Komplexes AB erfolgt dann nach einer reversiblen Reaktion pseudo-erster Ordnung mit der Geschwindigkeit:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k' \times [B] - k_{off} \times [AB] \quad \text{mit} \quad k' = k_{on} \times [A]$$

Gleichung 6

Die Lösung der Differentialgleichung lautet:

$$[AB] = \frac{k' \times [B]_{t=0}}{k' + k_{off}} - \frac{k' \times [B]_{t=0}}{k' + k_{off}} \times e^{-t \times (k' + k_{off})}$$

Gleichung 7

$[B]_{t=0}$ : Konzentration von B zum Zeitpunkt  $t=0$

Bei einem Überschuß von A erfolgt die reversible Bildung des Komplexes AB also mit einer scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten von:

$$k_{obs} = k_{on} \times [A] + k_{off}$$

Gleichung 8

### Fluoreszenzspektrometrie

Die Bestimmung der Dissoziationsrate ( $k_{off}$ ) des Komplexes aus Ran-mGppNHp-RanBP1 und Ran-mGppNHp-Importin-beta, so wie Dissoziationsrate von Ran-mGDP erfolgte mit einem Fluoromax-Spektrofluorimeter (SPEX Instruments S. A., Inc., NJ, USA) bei 20°C in Biacore-Puffer (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Die mant-Gruppe wurde bei 350 nm angeregt und die Emission bei 450 nm detektiert. Die Integrationszeit betrug 1 s.

Vor der Detektion der Dissoziation, wurde eine Komplex aus 0,2 µM Ran-mGppNHp und 2 µM RanBP1, bzw. 2 µM Importin-beta erzeugt. Die Reaktion konnte dann nach Zugabe von 4 µM Ran-GppNHp verfolgt werden. Jedes RanBP1, bzw. Importin-beta-Molekül, das den Komplex verließ, wurde durch den großen Überschuß an Ran-GppNHp gebunden. Die Messung der intrinsischen Nukleotidaustauschgeschwindigkeit von Ran (Dissoziation von Ran-mGDP) wurde durch Inkubation von mit mGDP beladenen Ran in Gegenwart von nicht fluoreszierendem GDP durchgeführt. Hier wurde durch einen 100fachen Überschusses an GDP die Rückbindung von mGDP verhindert. Die jeweilige Dissoziation entsprach einer Reaktion erster Ordnung.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Grafit 3.0 Software (Erithacus Ltd, Staines, UK) durch Anpassung von einfach exponentiellen Funktionen. War dies nicht möglich, wurden die Daten einer doppelt exponentielle Funktion angepaßt.

### Stopped-Flow-Kinetik

Schnelle Reaktionsverläufe (für Geschwindigkeitskonstanten  $k > 0.1/s$ ) wurden an einer SX.18MV-Stopped-flow-Apparatur der Fa. Applied Photophysics (Leatherhead, U.K.) untersucht. Für mant-Nukleotiden (N-Methylantraniloyl-) und 1,5-IAEDANS-markierte Proteine erfolgte die Anregung durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 350 nm. Die Emission wurde für emittiertes Licht der Wellenlänge  $> 409$  nm (Kantenfilter) verfolgt.

Bei dieser Technik werden die Lösungen zweier Reaktanden durch Druckluft aus zwei Spritzen in eine Mischkammer und danach in eine Beobachtungskammer geschossen. Durch die Unterbrechung des Flusses mit Hilfe eines Kolbens („stopped flow“) verbleibt die Mischung in der Beobachtungskammer und kann dort anhand der Fluoreszenz kinetisch verfolgt werden. Die Totzeit zwischen Mischen und Beginn der Messung beträgt bei diesem Gerät etwa 1-2 ms. Für die Auswertung der Kinetiken wurde

zur Anpassung von einfach exponentiellen Funktionen die geräteeigene Software benutzt. Die weitergehende Auswertung erfolgte mit der Graft 3.0 Software (Erithacus Ltd, Staines, UK).

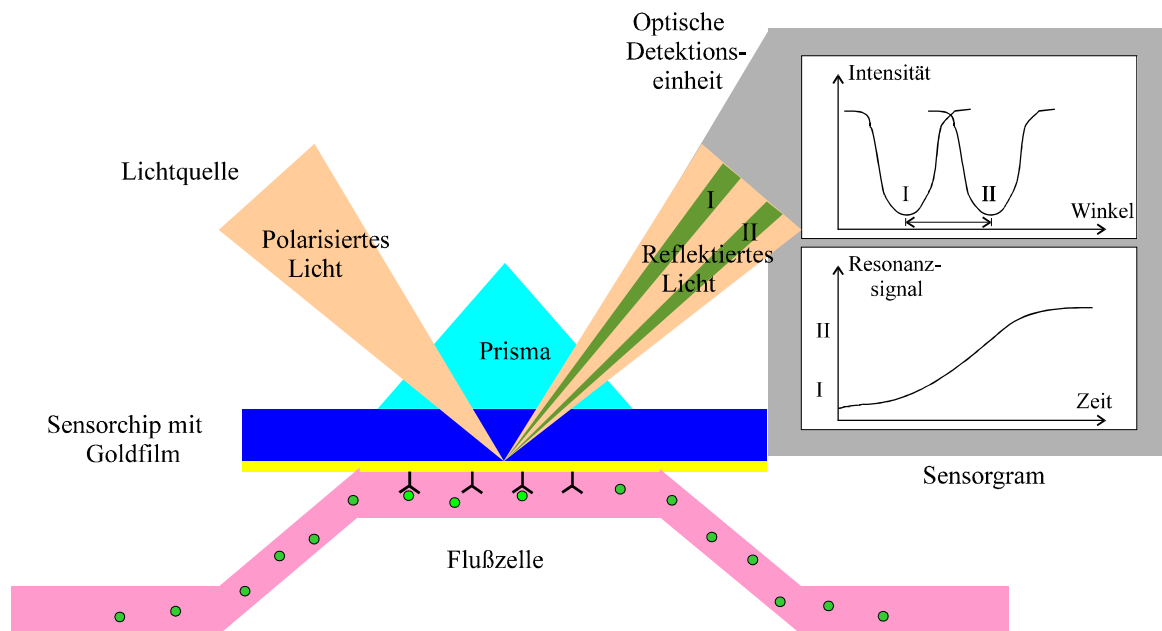
Die Stopped-flow-Apparatur wurde zur Bestimmung der RCC1-katalysierte Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran genutzt. Hierzu wurden  $0,2 \mu\text{M}_{[\text{End}]}$  Ran-mGDP in 10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  mit verschiedenen Konzentrationen RCC1 und  $20 \mu\text{M}_{[\text{End}]}$  GDP in der Reaktionskammer zusammengeschossen.

Ebenfalls wurden hier die Assoziationskonstanten der Bildung verschiedener Komplexe (Ran-mGppNHp-RanBP1; Ran-mGppNHp-Importin-beta, Ran<sub>1,5</sub>-IAEDANS GDP-RCC1 und die Bindung von mGDP an Ran-RCC1) ermittelt. Mit Ausnahme der Assoziation von mGDP und Ran-RCC1 wurden hierfür  $0,2 \mu\text{M}$  Ran-mGXP (bzw.  $0,2 \mu\text{M}$  Ran<sub>1,5</sub>-IAEDANS) mit verschiedene Konzentrationen RanBP1, Importin-beta und RCC1 zusammengeschossen und die Reaktion verfolgt. Für die Beobachtung der Assoziation von mGDP an den Ran-RCC1-Komplex, wurden je  $0,8 \mu\text{M}$  zusammengegeben. Durch Anpassung der Daten an eine einfach exponentielle Gleichung wurden die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{obs}}$ ) erhalten. Nach Auftragung gegen die jeweilige Konzentration an RanBP1, Importin-beta und RCC1 wurde  $k_{\text{on}}$  ermittelt.

### 2.2.3.2 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

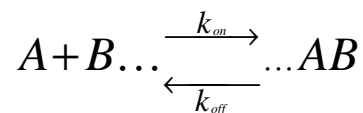
Mit Hilfe eines BIAcore™ Geräts (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) kann man die Bindung eines Analyten an ein immobilisiertes Molekül messen (Chaiken et al., 1992; Szabo et al., 1995). Das System besteht aus einem Sensorchip, einem Laser, der polarisiertes Licht emittiert, einem Diodenarray-Detektor und einem automatischen Flußsystem (s. Abbildung 10). Der Sensorchip besteht aus einer Glasschicht, die mit einer dünnen Goldschicht belegt ist. Darüber liegt eine Matrix, an der ein Fängermolekül immobilisiert werden kann. Eine Lösung des Analyten wird durch ein Flußsystem in eine Meßzelle geleitet. Eine Wand dieser Meßzelle wird durch die Oberfläche des Sensorchips hergestellt. Die Bindung des Analyten wird durch ein optisches System vermittelt. Dabei wird polarisiertes Laserlicht durch ein Prisma kegelförmig auf die Glasschicht des Sensorchips eingestrahlt. An der Grenzfläche zwischen Glas und Goldfilm wird das Licht aufgrund des hohen Einfallswinkels totalreflektiert. Ein Teil des Lichts dringt als sogenannte evaneszente Welle in die Goldschicht ein und interagiert mit dem Elektronengas (Plasmon) der Goldschicht. Dieses Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz tritt nur bei einem bestimmten Einfallswinkel auf, der abhängig von der optischen Dichte der Matrix ist. Das reflektierte Licht weist unter dem entsprechenden Ausfallswinkel ein Intensitätsminimum auf, das als SPR-Winkel (Surface Plasmon Resonance) von dem Diodenarray detektiert wird. Bindet ein Analyt an das in der Matrix immobilisierte Fängermolekül, so ändert sich die optische Dichte, wodurch sich der SPR-Winkel ändert. Das BIAcore™ Gerät mißt diesen SPR-Winkel als RU (resonance units). 1000 RU entsprechen einer Verschiebung

des SPR-Winkels um 360 Winkelsekunden bzw. einer Massenänderung in der Matrix von  $1 \text{ ng/mm}^2$ .



**Abbildung 10: Schematische Darstellung eines BIAcore™-Geräts**

Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter der Bindung eines Analyten (A) an ein immobilisiertes Molekül (B) geht man von einer bimolekularen Reaktion aus:



Gleichung 9

Die Kinetik der Bildung des Komplexes (AB) wird beschrieben durch:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{\text{on}} \times [A]_t \times ([B]_0 - [AB]_t) - k_{\text{off}} \times [AB]_t$$

Gleichung 10

mit  $[B]_0$  = maximale Konzentration des immobilisierten Moleküls. Die Änderung des Resonanzsignals im BIAcore™-System entspricht der Bildung des Komplexes ( $dRU \approx d[AB]$ ). Dabei wird angenommen, daß in dem automatischen Fließsystem des BIAcore™-Geräts zu jedem Zeitpunkt die Konzentration an freiem Liganden konstant ist ( $C = [A]_t$ ). Durch Umformung erhält man:

$$\frac{dRU}{dt} = k_{on} \times C \times RU_{max} - (k_{on} \times C + k_{off}) \times RU_t$$

Gleichung 11

Die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit ( $k_{obs}$ ) entspricht dann:

$$k_{obs} = k_{on} \times C + k_{off}$$

Gleichung 12

Bei Auftragung von  $k_{obs}$  gegen  $C$  liefert die Geradensteigung  $k_{on}$  und der Ordinatenabschnitt  $k_{off}$ .

Unter der Voraussetzung, daß keine Reassoziaton von freiem Liganden auftritt, kann die Dissoziationsreaktion als Kinetik 1. Ordnung beschrieben werden:



Gleichung 13

Die Änderung des Resonanzsignals entspricht dann:

$$\frac{dRU}{dt} = -k_{diss} \times RU_t$$

Gleichung 14

Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion wird aus folgender Gleichung kalkuliert:

$$\ln(RU_{t1} - RU_{tn}) = k_{off} \times (t_n - t_1)$$

Gleichung 15

$RU_{t1}$  = Resonanzsignal zum Zeitpunkt  $t_1$  der Dissoziation,

$RU_{tn}$  = Resonanzsignal zum Zeitpunkt  $t_n$ )

Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wird schließlich aus den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion errechnet:

$$K_D = \frac{[A] \times [B]}{[AB]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Gleichung 16

### Messungen mit dem Sensorchip CM5

Die Matrix des CM5-Sensorchips besteht aus einer Carboxymethyldextranschicht, an die durch verschiedene Arten chemischer Kopplung Fängermoleküle kovalent gebunden werden können (O'Shannessy et al., 1992). Alle Immobilisierungen und Messungen wurden bei 20°C und 5 µl/min Flußrate mit Biacore Laufpuffer (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.0005 % Igpal) durchgeführt. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit der BIAevaluation Software Version 2.1 (BIAcore AB, Uppsala, Schweden).

Die kovalente Kopplung von anti-GST-Antikörpern (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) erfolgte durch Kopplung von primären Amingruppen des Antikörpers an die Carboxylgruppen der Matrix. Zunächst wurde die Oberfläche mit einer Mischung aus je 50 mM N-Ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-hydroxysuccinimid (NHS) in Wasser 10 Minuten aktiviert. Danach erfolgte die Kopplung von anti-GST-Antikörpern (0.016 g/l in 10 mM Na-Acetat pH 5.0) für 7 min. Restliche aktivierte Gruppen wurden durch eine 7minütige Injektion von 1 M Ethanolamin pH 8.5 abgesättigt.

GST-Fusionsproteine (2-4 µM in Biacore Puffer) wurden durch eine 7minütige Injektion in den Pufferstrom an die mit anti-GST Antikörpern beladene Sensorchipoberfläche gebunden. Danach wurde 8 Minuten mit Puffer nachgespült, wodurch schwach- und/oder ungebundene Proteine entfernt wurden. Anschließend konnte die Assoziation verschiedener Konzentrationen eines Liganden an das GST-Fusionsprotein und die Dissoziation durch Nachspülen mit Puffer verfolgt werden.

Bei der Interaktionsanalyse von RCC1 an GST-Ran-GDP wurde die Matrix zunächst mit 0,1 g/l GST-Ran-GDP geflutet und hierdurch beladen. Nach der Beladung und 8minütiger Pufferspülphase wurden unterschiedliche Konzentrationen RCC1 über das matrixgebundene GST-Ran-GDP gegeben und die Assoziation verfolgt. Die Dissoziation konnte nach der Komplexbildung aus GST-Ran und RCC1 während einer weiteren Pufferspülphase betrachtet werden.

Die Regeneration der Matrix erfolgte durch Spülen der Oberfläche mit 3 M Guanidiniumchlorid und anschließend mit 0.05 % SDS für je 2 min. Alle nicht kovalenten Bindungen wurden dadurch zerstört, während die Aktivität der anti-GST Antikörper erhalten blieb.



## 2.2.4 Kristallographische Methoden

### 2.2.4.1 Kristallisation

Aus der Proteinreinigung konnten hochreine Proteinlösungen erhalten werden, die im folgenden für die Kristallisation eingesetzt wurden. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden Proteinlösungen in hoher Konzentration (90 mg/ml) sofort nach der Präparation schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Aliquots dieser Stammlösung wurden dann vor dem Ansetzen der Kristallisationsschalen aufgetaut und verwendet.

Zur Kristallisation wurde die Hängetrophen-Methode angewandt, die nach dem Prinzip der Dampfdiffusion in langsamen Schritten die Konzentration des Fällungsmittels in der Proteinlösung erhöht. Die Ansätze wurden in Zellkulturplatten der Fa. Linbro (Linbro, Flow Laboratories Inc., VA, USA) gemacht. Das Volumen der Reservoirolösung betrug jeweils 1 ml; der hängende Tropfen setzte sich aus 1 bis 5 µl Proteinlösung und 1 bis 5 µl Reservoirolösung zusammen.

Mit Hilfe kommerziell erhältlicher Screening-Kits (Hampton Research, Laguna Hills, CA, USA) wurde bei verschiedenen Temperaturen (4 und 20 °C) nach ersten Bedingungen für die Kristallisation gesucht. Bei dieser Strategie handelt es sich um ein so genanntes „Sparse Matrix Sampling“, bei dem verschiedene Fällungsmittel, pH-Werte und Salze in 100 Lösungen kombiniert und auf Proteinkristallbildung getestet werden. Die Basis dieser Kombinationen ist eine statistische Auswertung typischer Kristallisationsbedingungen für Proteine (Cudney et al., 1994; Jancarik und Kim, 1991).

Erste Kristalle wurden bei 20°C in einer 20%igen PEG3350 (polyethylen glycol), 200 mM KF (Hampton Peg/ion-Screen; Hampton Research, Laguna Hills, CA, USA) erzeugt. Diese Kristalle wurden dann kleingestoßen und in einem folgenden Ansatz als Anlagerungsstelle für kristallisierende Proteine genutzt (Micro-Seeding). In einem durch „Micro-Seeding“ unterstützten Ansatz konnten Kristalle für den binären Komplex aus Ran und RCC1 bei 20 °C mit folgender Reservoirolösung erhalten werden: 12,5-10% (w/v) PEG4000, 200 mM KF und 3 mM DTE. Ca. 1,5-3 Monate danach wuchsen in einem Ansatz von Louis Renault (Kooperationspartner des Kristallisationsprojektes) Kristalle mit einer Größe von 0,1 x 0,7 x 0,05 mm<sup>3</sup>. Diese Kristalle konnten in der gleichen Lösung (12,5-10% (w/v) PEG4000, 200 mM KF und 3 mM DTE) eingefroren und von Louis Renault am ESRF (Grenoble, France) zu Datensammlung genutzt werden.

Für den ternären Komplex aus Ran-GDP-RCC1d1-19 wurde ebenfalls die Hängetrophen-Methode angewandt. Der aufgereinigte Ran-RCC1-Komplex wurde in Tropfen aus 1 bis 5 µl Proteinlösung und 1 bis 5 µl Reservoirolösung zusammengesetzt. Im Anschluß wurde GDP (1 µM) zugegeben, damit sich der ternäre Komplex ausbilden kann. Parallel wurden Kristallisationsansätze mit RanT24N und RCC1d1-19 in gleicher Weise durchgeführt. In beiden Fällen wurde mit Hilfe kommerziell erhältlicher Screening-Kits

(Hampton Research, Laguna Hills, CA, USA) bei verschiedenen Temperaturen (4 und 20 °C) nach ersten Bedingungen für die Kristallisation gesucht.

Für Ran·GDP·RCC1d1-19 stellte sich als erfolgversprechenster Versuchsansatz heraus, daß zunächst erste Kristalle von RCC1d1-19 bei 20°C in 0,1 M MPS pH 6,5, 1,4 M Ammoniumsulfat und 0,1 M Natriumchlorid erzeugt werden mussten, die dann für ein Micro-Seeding in einen Ansatz aus Ran·RCC1d1-19 genutzt wurden (20°C, 0,1 M MPS pH 6,5, 1,4 M Ammoniumsulfat und 0,1 M Natriumchlorid), dem ca. 1-2 h danach GDP zugesetzt wurde. Hier konnten nach ca. einem Monat Kristalle in einer Größe von  $0,04 \times 0,02 \times 0,01 \text{ mm}^3$  gefunden werden. Versuche, größere Kristalle zu erhalten, schlugen fehl. Es wurden daher diese Kristalle von Louis Renault im ESRF (Grenoble, Frankreich) bei 100 K in 30% Glycerol, 17.5% PEG4000, 200 mM KF und 3 mM DTE vermessen. Ein verwertbarer Datensatz konnte jedoch nicht erhalten werden.

Für die Ansätze mit RanT24N, RCC1d1-19 und dem Zusatz von GDP konnten keine erfolgversprechenden Kristallisationsbedingungen ermittelt werden.

## **2.2.5 Zellkultur und Mikroinjektion**

### **2.2.5.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien**

Im folgenden werden allgemeine Methoden der Zellkultur beschrieben, bevor auf die besonderen Bedingungen der Zelllinien eingegangen wird.

#### **Auftauen von Zellen**

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden auf Eis transportiert. Nach zügigem Auftauen in einem 37°C Wasserbad wurden die Zellen in ein steriles Reagenzröhrchen mit 5 ml Medium transferiert und dann 3 Minuten bei ca. 800 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in die Kulturschale pipettiert. Bis zur zweiten Zellpassage wurde dem Medium 10 mg/l Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

#### **Zellpassage**

Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin/EDTA gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA bis zur Ablösung vom Boden der Kulturschale im Brutschrank inkubiert. Durch Spülen mit einer sterilen Pipette wurden die Zellen suspendiert, wie oben beschrieben abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und auf neue Kulturschalen verteilt.

#### **Einfrieren**

Nach Ablösen und Zentrifugation wurden die Zellen einer Kulturschale in 0.5 ml eines auf Eis gekühlten DMSO-Mix (10 % (v/v) Dimethylsulfoxid, 88 % Fötales Kälberserum (FCS), Penicillin/Streptomycin (10 mg/l)) resuspendiert und in Cryoröhrchen portioniert. Der Einfriervorgang erfolgte durch Inkubation der Zellen auf Eis für 30 min, bei -20°C für 24 Stunden, bei -80°C für 1 Woche und danach in flüssigem Stickstoff.

### **HeLa-Zellen**

HeLa-Zellen wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (+Natriumpyruvat, + 1000 g/l Glucose, + Pyridoxin) unter Zusatz von 10 % nicht-inaktiviertem FKS und 0.3 g/l L-Glutamin kultiviert. Die Zellen wurden bei 37°C und 7,5 % CO<sub>2</sub> in 10 ml Schalen (Corning, New York, USA) kultiviert und zwei- bis dreimal pro Woche passagiert.

### **BHK21-Zellen**

BHK21-Zellen wurden in Medium 199 mit Earle's Salzen unter Zusatz von 1 mM Natriumpyruvat MEM, 2 mM L-Glutamin, 1x nichtessentielle Aminosäuren-Lösung (ohne L-Glutamin) 1 % FKS bei 37°C und 7.5 % CO<sub>2</sub> in 10 ml Schalen kultiviert. Für die Mikroinjektion wurden sie in 2.5 ml Schalen transferiert.

#### **2.2.5.2 Mikroinjektionen**

Für die Mikroinjektion wurden die Peptide (20 µM) mit sterilem Importpuffer (20 mM KPi-Puffer pH 7,2, 140 mM K-Acetat, 5 mM Mg-Acetat, 0,5 mM EGTA, 200 mM Succrose) verdünnt und mit Hilfe von Mikropipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg) in Injektionskapillare pipettiert. Die Borosilicat Mikroelektrodenkapillare (Hilgendorf, Malsfeld) waren zuvor mit einem Kapillarenpuller (Bachhofer, Reutlingen) gezogen worden (übliche Einstellung: 2.56/10/10/10) und hatten einen Spitzendurchmesser von kleiner 0.5 µm. Die Injektion erfolgte mit einem automatisierten Injektionssystem AIS (Zeiss, Oberkochen) unter Beobachtung der Zellen mit einem inversen Mikroskop Laser Scanning Mikroskop (Zeiss, Oberkochen). Die Einstellung des Injektionsdrucks (zwischen 50 und 300 hPa) war abhängig vom Spitzendurchmesser.

#### **2.2.5.3 Kerntransport Import-Assay**

Die HeLa-Zellen wurden für den Import-Assay zwei Tage vor Versuchsbeginn in 10 ml Kulturschalen auf sterilen, runden Deckgläschen (d = 1,5 cm) kultiviert, die in die Kulturschalen gelegt wurden. Nach ein bis zwei Tagen waren die adhäsiven Zellen dann an die Deckgläschen angewachsen.

Für die Permeabilisierung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 4°C kaltem Permeabilisierungspuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 5 mM Mg-Acetat, 50 mM K-Acetat, 2 mM EGTA, 2 mM Dithiothreitol, Digitonin 40 µg/ml und Proteaseinhibitoren: 10 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Chymostatin, 1 µg/ml Elastatinal) 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit Digitonin freiem Puffer gewaschen.

Direkt am Mikroskop wurden die permeabilisierten Zellen in die Spannvorrichtung gebracht. Nach Justierung und Voreinstellung des Mikroskops wurde die Reaktion durch Zugabe der vorbereiteten Importlösung (20 µl) bei Raumtemperatur gestartet und aufgezeichnet.

Für die Vorbereitung der Importlösung wird zunächst das Fusionsprotein IBB (Importin-beta-Bindungsdomäne) -GFP (2 µM) mit Importin-beta in Importpuffer (20 mM

KPi-Puffer pH 7,2, 140 mM K-Acetat, 5 mM Mg-Acetat, 0,5 mM EGTA, 200 mM Succrose) in einem Verhältniss 1:1 30 min vorinkubiert. Der Komplex aus IBB-GFP und Importin beta ist so bereits vor Reaktionsbeginn ausgebildet, wodurch ausgeschlossen wird, daß dieser Schritt für die Importreaktion zeitlimitierend wird. Außerdem besteht diese Lösung noch aus einem sog. E (Energie)-Mix (0,5 mM ATP, 0,5 mM GTP, 10 mM Kreatinphosphat, 50 µg/ml Kreatinkinase), der eine Regeneration von GTP gewährleistet. Nach der 30minütigen Inkubation (vor Versuchsbeginn) werden der Importlösung die übrigen für den Transport relevanten Faktoren wie Ran·GDP (0,3 µM), RanBP1 (0,3 µM), Rna1 (0,2 µM) und NTF2 (0,4µM) zugegeben.

#### **2.2.5.4 MPS-NLS-Transport-Assay**

HeLa-Zellen wurden für den MPS-NLS-Transport-Assay zwei Tage vor Versuchsbeginn in 10 ml Kulturschalen auf sterilen, runden Deckgläschen kultiviert (s. Kerntransport Import-Assay). Ein bis zwei Tage danach wurden die in Importpuffer (20 mM KPi-Puffer pH 7,2, 140 mM K-Acetat, 5 mM Mg-Acetat, 0,5 mM EGTA, 200 mM Succrose mit dem Zusatz von 40 % EtOH, um die Peptide in Lösung zu bekommen) gelösten Peptide zu den Zellen in das Kulturmedium gegeben. Es wurden verschiedene Konzentrationen (2 µM, 8 µM und 30 µM) eingesetzt und zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (10min und ÜN) betrachtet. Als Kontrolle wurden HeLa-Zellen nur mit EtOH behandelt, was den Zellen in den anderen Ansätzen durch den Importpuffer zugeführt wurde. Die Reaktion wurde durch Waschen der Deckgläschen mit einer 3,7 %igen Formaldehydlösung gestoppt. Nach anschließendem mehrfachen Waschen in PBS-Puffer wurden die auf Deckgläschen angewachsenen HeLa-Zellen auf Objektträgern fixiert (mit Mukasol) und bis zur mikroskopischen Betrachtung bei 4°C aufbewahrt.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1.1 Kristallisationsansätze mit Ran·GDP und RCC1

Die Kristallisation von Proteinen oder Proteinkomplexen ist eine Grundvoraussetzung für röntgenkristallographische Untersuchungen. Mit dieser Methode ist es möglich, Informationen über die dreidimensionale Struktur von Proteinen und Nukleinsäuren zu erhalten. Aus diesen Strukturdaten mit atomarer Auflösung können Wechselwirkungen einzelner Aminosäuren oder Atome entnommen werden. Sind bereits verschiedene Strukturinformationen wie im Fall von Ran und RCC1 vorhanden, ist ein Vergleich dieser Komplexe untereinander möglich. Hieraus können Rückschlüsse gezogen werden, anhand derer die Rekonstruktion des Reaktionsablaufs erfolgen kann. Durch die Kristallisation des binären und ternären Komplexes wurden Einblicke in den RCC1-katalysierten Nukleotidaustausch an Ran erwartet. Bei der Kristallisation, die in einer Kooperation mit Louis Renault durchgeführt wurde, wurden Ansätze mit verschiedenen Ran- und RCC1-Konstrukten ohne und mit Zusatz von GDP durchgeführt.

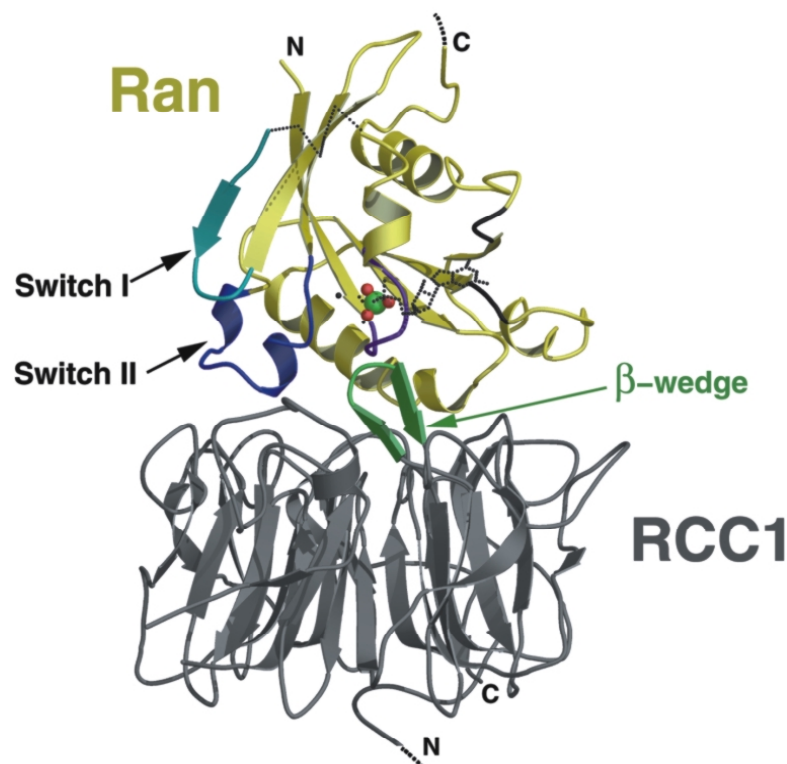
Der Grund für die Kristallisation des ternären Komplexes war die Darstellung eines intermediären Reaktionszustands, bei dem die Interaktionspartner eine nicht abgeschlossene Austauschreaktion darstellen. Hierzu wurden Kristalle von RCC1d1-19 mit Hilfe der Vapour-Diffusions-Methode und hängendem Tropfen erzeugt, die innerhalb von einer Woche wuchsen. Diese Kristalle wurden im Anschluss für ein Micro-Seeding im Ansatz eines Ran·RCC1d1-19-Komplexes (220  $\mu\text{M}$ ) verwendet, dem GDP (340  $\mu\text{M}$ ) zugefügt wurde, was sich in den Komplex aus Ran und RCC1d1-19 einlagern sollte. Für diesen Komplex aus Ran·GDP·RCC1d1-19 konnten nach einem Monat Kristalle in einer Größe von  $0,04 \times 0,02 \times 0,01 \text{ mm}^3$  gefunden werden. Zahlreiche Versuche, größere Kristalle zu erhalten, schlugen fehl. Es wurden daher diese Kristalle im ESRF (Grenoble, Frankreich) bei 100 K in 30% Glycerol, 17.5% PEG4000, 200 mM KF und 3 mM DTE vermessen. Ein verwertbarer Datensatz konnte jedoch nicht erhalten werden. Kristallisationsbedingungen bei denen der Komplex aus RanT24N und RCC1d1-19 verwertbare Kristalle erzeugte, konnten ebenfalls nicht gefunden werden.

Die Kristalle, aus denen der Datensatz für den binären Ran·RCC1d1-19-Komplex (Renault et al., 2001) gewonnen wurde, wurden ebenfalls mit Hilfe der Vapour-Diffusions-Methode und hängendem Tropfen erzeugt. Erste Kristalle konnten ca. zwei Monaten nach Ansatz erhalten werden und für ein Micro-Seeding genutzt werden. Im Folgenden Ansatz wuchsen dann innerhalb von ein bis drei Monate Kristalle. Kristalle mit der maximalen Größe von  $0,1 \times 0,07 \times 0,05 \text{ mm}^3$  konnten nur einmalig in einem Ansatz des Kooperationspartners Louis Renault gefunden werden. Ihm ist es gelungen sie im ESRF (Grenoble, Frankreich) zu vermessen und dort einen verwertbaren Datensatz zu erhalten. Es wurden Daten von vier Kristallen verwendet, um mit einem kompletten Datensatz arbeiten zu

können. Mit Hilfe der vorhandenen Strukturen von Ran (Scheffzek et al., 1995) und RCC1 (Renault et al., 1998) konnte durch die molecular replacement Methode von AmoRe (Navaza, 2001) die Komplexstruktur aus Ran und RCC1 gelöst werden.

### 3.1.2 Strukturanalyse des Ran•RCC1-Komplexes

Die Interaktionen zwischen Ran und seinem Austauschfaktor RCC1 befinden sich wie vermutet auf der gegenüberliegenden Seite der Chromatinbindungsstelle von RCC1. Diese Vermutung resultiert aus Modellierungsexperimenten mit Ran•GDP (Scheffzek et al., 1995) und RCC1 (Renault et al., 1998) und aus Ergebnissen biochemischer Messungen (Azuma et al., 1999).

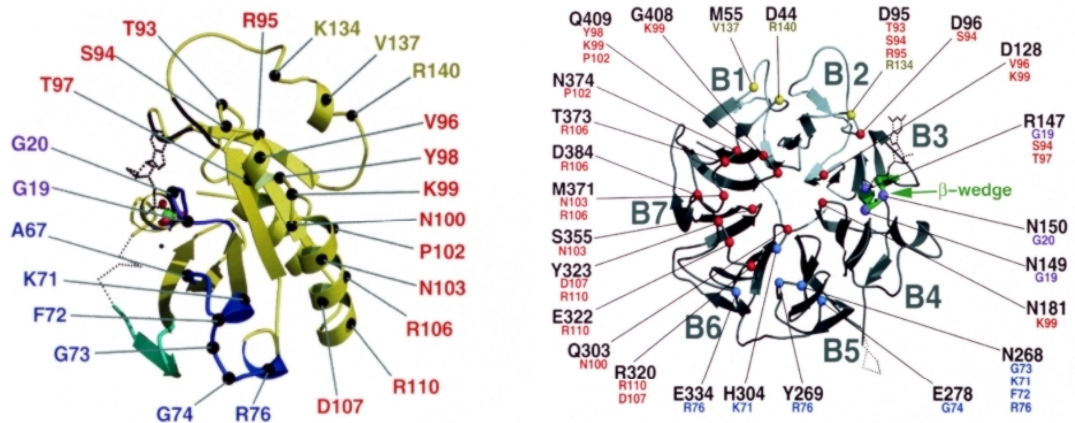


**Abbildung 11: Röntgenkristallstruktur von Ran und RCC1 im Komplex.** RCC1 ist grau dargestellt, wobei sein extra beta-Faltblatt in grün hervorgehoben ist. Ran ist gelb, hier sind Switch-I und II in hell- und dunkelblau, der P-Loop in violett und das Basenbindungsmotiv (NKxD<sub>122-125</sub> und SAK<sub>149-151</sub>) in schwarz hervorgehoben. Das Anion (grün/rot) ist mit dem in die Struktur modellierten GDP innerhalb der Nukleotidbindungstasche zu erkennen (Renault et al., 2001)

Der Ran•RCC1-Komplex (s. Abbildung 11) enthält 475 Wassermoleküle und ein Polyanion, daß sich innerhalb der Nukleotidbindungstasche befindet. Die Überlagerung der freien RCC1-Struktur mit der Ran-gebundenen Struktur zeigt, daß sich nur sehr geringe strukturelle Veränderungen in RCC1 durch die Komplexbildung ergeben. Im Gegensatz hierzu zeigt Ran kleine bis starke Veränderungen in verschiedenen Bereichen, vornehmlich jedoch im Nukleotidbindungsbereich. Der in die Nukleotidbindung involvierte Switch-I behält zwar mit dem beta-Strang (beta-2<sub>E</sub>) eine der Ran•GDP-Struktur vergleichbare Konformation, die Aminosäuren 32<sup>R</sup>-36<sup>R</sup> sind jedoch so flexibel, daß sie sich durch einen

hohen B-Faktor auszeichnen oder ihre Elektronendichte garnicht nicht erfasst werden konnte. Ebenfalls ist der für die Bindung einiger Effektoren wichtige C-terminale Ran-Rest aufgrund seiner Flexibilität vom Aminosäurerest 178<sup>R</sup> an nicht zu sehen.

Durch die Komplexbildung erschließt sich eine Gesamtkontaktfläche von 2700 Å<sup>2</sup>. Die Kontaktstellen von Ran mit seinem Austauschfaktor RCC1 liegen im Bereich des P-Loops, Switch-II, alpha-Helix-3 und alpha-Helix-4. 24 Aminosäurereste von Ran und 25 von RCC1 sind in die Kontaktbildung involviert (s. Abbildung 12).



**Abbildung 12: Kontaktierende Aminosäuren innerhalb des Ran-RCC1-Komplexes.** Hervorgehoben sind durch die Komplexbildung in Kontakt tretende Aminosäuren (Interaktionsradius bis 3,5 Å). Ran links und RCC1 rechts. Die Farbgebung der Aminosäuren entspricht einer Region in Ran (Renault et al., 2001).

Im Unterschied zu anderen Komplexen von GTPasen mit ihrem Austauschfaktor (Boriack-Sjodin et al., 1998; Goldberg, 1998; Worthylake et al., 2000) sind Switch-I und ihn umgebende Aminosäuren nicht in die Interaktion involviert. Bei RCC1 ist jedes Blatt der siebenblättrigen Propellerstruktur mit in die Ran-Interaktion eingebunden. Die Kontaktstellen konzentrieren sich um den P-Loop (19<sup>R</sup>, 20<sup>R</sup>), Switch-II (67<sup>R</sup> -76<sup>R</sup>), alpha-Helix-3 (93<sup>R</sup> -110<sup>R</sup>) und alpha-Helix-4 (134<sup>R</sup> -140<sup>R</sup>).

Ein auffälliges Element ist das extra-beta-Faltblatt (146-153) von RCC1. Es ragt aus der sonst gleichmäßigen Struktur, die durch die Wiederholung der sieben Schleifen oder Blätterstruktur geprägt ist, deutlich heraus. Mit diesem starr hervortretenden Element ragt RCC1 eine 423 Å<sup>2</sup> große Oberfläche in Ran hinein. Diese rammenartige Struktur schiebt sich zwischen den P-Loop und Switch-II von Ran. Zusätzlich interagiert es mit alpha-Helix-3.

Der großflächigste Kontaktbereich liegt um die Region von alpha-Helix-3 von Ran mit einer Fläche von 1590 Å<sup>2</sup>. Alpha-Helix-3 ist in Kontakt mit allen RCC1-Blättern mit Ausnahme von Blatt-5. Dieses interagiert spezifisch mit Switch-II. Switch-II ist der zweitgrößte Interaktionsbereich mit ausgedehnten Veränderungen und umschließt eine Fläche von 752 Å<sup>2</sup>. Letztlich kontaktiert Ran alpha-Helix-4 die RCC1 Blätter 1 und 2.

### 3.1.2.1 Strukturelle Veränderungen

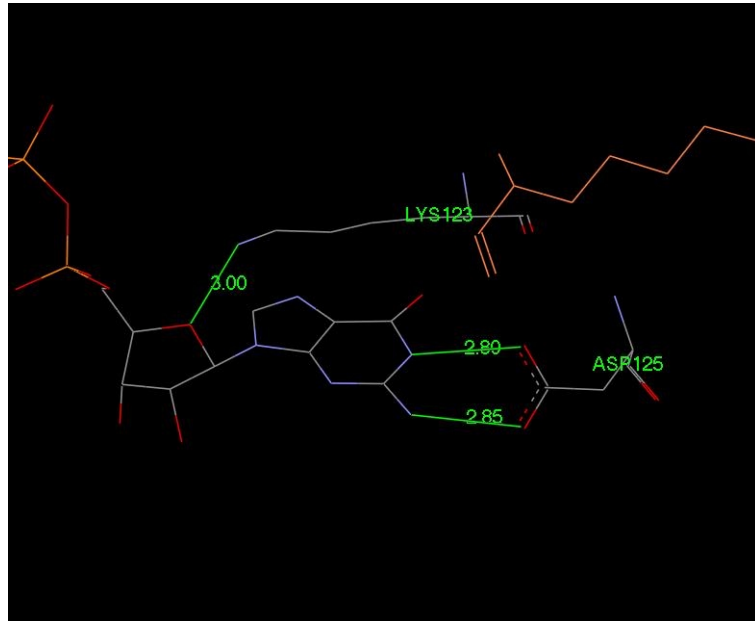
Der Vergleich der Ran-Struktur im Komplex und als freies Ran·GDP zeigt Unterschiede in Switch-II  $\alpha$ Helix-3/4 und um das Basenbindungsmotiv-NKxD<sub>122-125</sub>. Unterschiede zu den GTP-gebundenen Formen aus dem Ran·RanBD (Vetter et al., 1999a) und dem Ran·Importin- $\alpha$ -Komplex (Vetter et al., 1999b; Chook and Blobel, 1999) befinden sich in denselben Regionen.

Schon aus der RCC1-Struktur (Renault et al., 1998) geht hervor, daß das extra-beta-Faltblatt ein sehr starres Gebilde darstellt, welches durch eine Reihe von Interaktionen zwischen Haupt- und Seitengruppen stabilisiert wird. Diesen Eindruck bestätigt auch die Komplexstruktur. Sie zeigt, daß sich dieser Bereich nur um wenige Ångström (1,1-1,8 Å) gegenüber dem nicht komplexierten Protein verschiebt, obwohl er durch das Hineinragen in Ran starken Interaktionen ausgesetzt ist. Asparagin 149 und Asparagin 150, der äußerste Bereich des extra-beta-Faltblatts, stehen in engem Kontakt mit den Ran-P-Loop-Aminosäuren Glycin 19<sup>R</sup> und Glycin 20<sup>R</sup>. Der P-Loop wird als Einheit in Richtung Nukleotidbindungsseite bewegt, so daß sich das C- $\alpha$  des Glycin 19<sup>R</sup> um 1,4 Å, das Magnesium und beta-Phosphat bindende Threonin 24<sup>R</sup> um 1,7 Å verschieben.

Bei der Überlagerung des Komplexes mit den nukleotidgebundenen Strukturen von Ran·GDP und Ran·GppNHp zeichnen sich zwangsläufige sterische Kollisionen mit RCC1 ab. Große konformationelle Änderungen sind im guanosinbasenbindenden Bereich zu finden, die Vergleichbar auch im Ras·Sos-Komplex gefunden werden konnten (Boriack-Sjodin et al., 1998). Die sterischen Störungen, die sich durch die Überlagerung abgezeichnet haben, sind in der Komplexstruktur allerdings nicht mehr zu sehen. Es kommt aber auch nicht zu Interaktionen mit diesen Aminosäuren. Möglicherweise sind diese Veränderungen im basenbindenden Bereich auf die verlorene Base zurückzuführen. Ebenso ist möglich, daß die verlorene Base nicht Ursache der Veränderung ist, sondern eine Konsequenz derselben und so diese strukturellen Veränderungen ein notwendiger Teil der Nukleotidfreisetzungsreaktion sind.

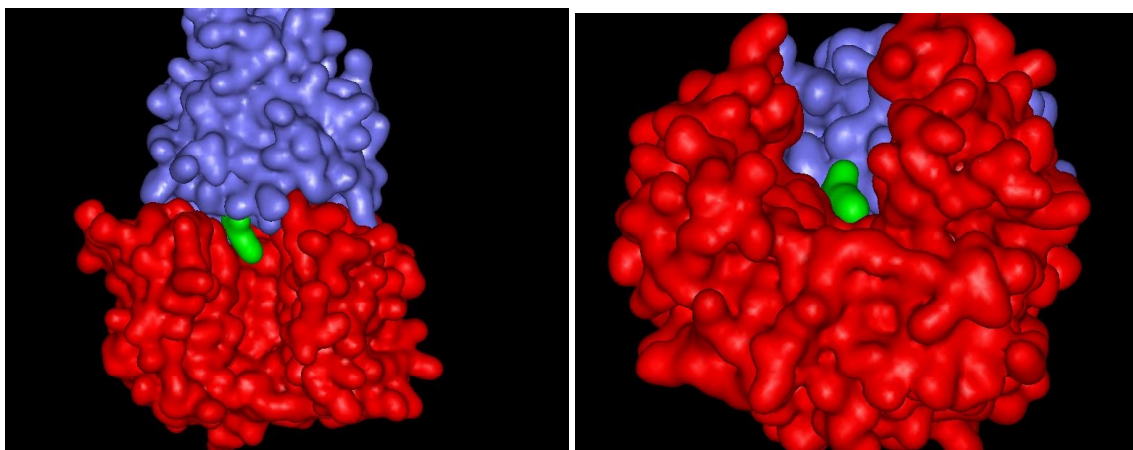
Ein Hinweis darauf, daß strukturelle Veränderungen zumindestens teilweise vor der Freisetzung des Nukleotids stattfinden und hierdurch die Dissoziation des Nukleotids unterstützen gibt die Interaktion mit  $\alpha$ -Helix-4. In der Komplexstruktur interagiert RCC1 mit der  $\alpha$ -Helix-4<sub>138-142</sub> unweit des NKxD<sub>122-125</sub>-Motives, was maßgeblich an der Nukleosidfixierung beteiligt ist. Die Aminosäuren des NKxD<sub>122-125</sub>-Motives verschieben sich um 4,5 Å, wobei Lysin 123<sup>R</sup> sich um einen Winkel von 180° dreht. Durch diese Umorientierung kann das NKxD<sub>122-125</sub>-Motiv nicht mehr zur Nukleotidbindung beitragen (s. Abbildung 13).





**Abbildung 13: Strukturelle Veränderungen im NKxD<sub>122-125</sub>-Motiv.** Dargestellt sind die nukleotidbindenden Aminosäuren Lysin 123 und Aspartat 125 aus der Ran-GDP-Struktur (Scheffzek et al., 1995) und ihre Distanz (in Å, grüne Linien) zum Nukleotid. In rot ist die um 180° gedrehte Position des Lysin 123 aus der Ran-RCC1-Struktur zu erkennen. Das Aspartat 125 aus der Ran-RCC1-Struktur ist aufgrund seiner starken Drehung nach unten hier nicht dargestellt (s. hierzu auch Abbildung 22). Die Abbildung wurde mit dem WebLab-Viewer® erstellt.

Eine weitere bemerkenswerte Änderung ergibt sich für das Lysin 99 (s. Abbildung 14). Das herausgestreckte RanK99 auf der alpha-Helix-3 befindet sich auf der RCC1 zugewandten Seite und ist in der Ran-GDP-Struktur frei zugänglich. Die Überlagerung mit der Ran-RCC1-Struktur zeigt, daß sich sterische Probleme mit dem stark konservierten GGMH<sub>75-78</sub>-Motiv von RCC1 ergeben. Diese sind jedoch durch eine Neuorientierung von RanK99 nicht mehr vorhanden. Ein von den sieben Blättern gebildeter Tunnel im RCC1-Zentrum ermöglicht ein weites Eindringen der Ran Aminosäure.



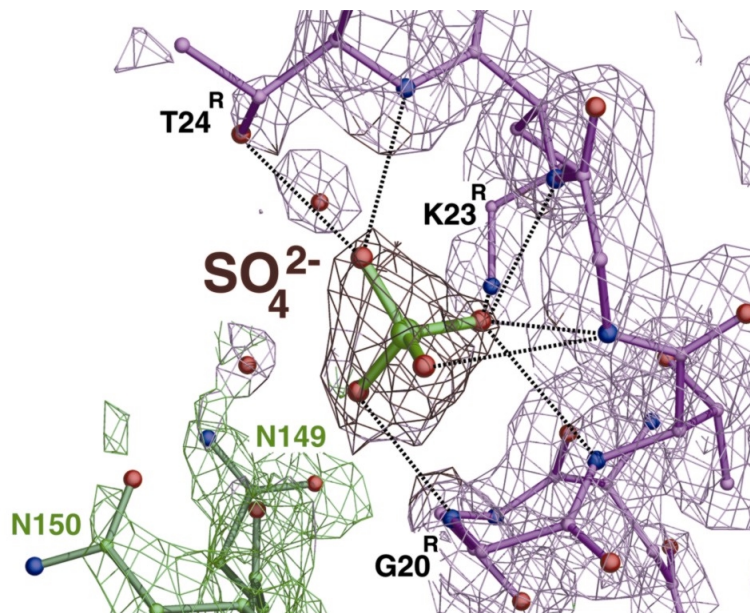
**Abbildung 14: Oberflächendarstellung des Ran-RCC1-Komplexes.** Das Lysin 99 ragt bei der Interaktion von Ran und RCC1 in den von RCC1 gebildeten Tunnel hinein. Um das Eindringen des RanK99 (grün) in die RCC1-Struktur (rot) zu erkennen, wurde von RCC1 der vordere Bereich nicht dargestellt. Ran (blau) ist unmodifiziert dargestellt (links = Seitenansicht, rechts = Ansicht von unten).

### 3.1.2.2 Die C-terminale Schleife

Ran hat im Unterschied zu anderen GTPasen eine lang ausgedehnte C-terminale Schleife mit einem konservierten DEDDDL-Motiv am Ende. Diese Schleife besteht aus einer alpha-Helix, die durch 16 Aminosäurereste vom restlichen Teil des Proteins getrennt ist. In der Ran·GDP-Struktur (Scheffzek et al., 1995) legt sich dieser Bereich an die Switch-I Region. Diese Interaktion stabilisiert Ran im GDP-Zustand und verhindert, daß die Effektorschleife (Switch·I) in die GTP-Konformation übergeht (Nilsson et al., 2002). Biochemische (Richards et al., 1995; Hieda et al., 1999) und strukturelle Untersuchungen (Vetter et al., 1999a; Vetter et al., 1999b; Chook and Blobel, 1999) haben gezeigt, daß das C-terminale Ende in der Ran-GTP-Form ungebunden und frei beweglich ist. In der Komplexstruktur von Ran-RCC1 liegt dieser Bereich ebenfalls ungebunden vor. RCC1 interagiert allerdings nicht direkt mit dem C-Terminus. Hier scheinen sterischen Probleme, die bei der Strukturüberlagerung zu erkennen sind, z. B. von K130<sup>R</sup> in der Ran-GDP-Form, und die daraus erfolgende Umlagerung der Reste 129<sup>R</sup>-142<sup>R</sup>, indirekt eine Neupositionierung der C-terminalen Helix zu bewirken und so im Fall von Ran·GDP den Kontakt zu Switch·I zu stören.

### 3.1.2.3 Bedeutung des Anions

Die Ran·RCC1 Kristallstruktur wurde als nukleotidfreier Komplex gelöst. Die zirkuläre Struktur des P-Loops, die normalerweise die Phosphate des Nukleotids umschließt, enthält ein Anion (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Koordination des Sulfats.** Darstellung der Elektronendichte des Ran-RCC1-Komplexes im Bereich der Nukleotidbindungsstelle. Durch die Interaktionen (schwarze Linien) mit P-Loops wird das Sulfat in seine Position gebracht (Interaktionsradius 3,25 Å). RCC1 (grün), Ran (violett), Sulfat (gelb-rot).

Dieses Anion ist wahrscheinlich ein  $\text{SO}_4^{-2}$  -wie später gezeigt werden konnte-, das aufgrund der Kristallisierungsbedingungen in die Struktur gelangen konnte. Der Zusatz von Sulfat war für die erfolgreiche Kristallisation des nukleotidfreien Komplex notwendig. Die Bindung dieses  $\text{SO}_4^{-2}$  wird über die gleichen Reste vermittelt wie die Bindung des beta-Phosphats in der Ran-GDP-Struktur. Die genaue Position ist in der Strukturüberlagerung um 1,7 Å zum beta-Phosphat verschoben. Da das Sauerstoffatom des T24<sup>R</sup> jedoch in der gleichen Weise zum Rückgratstickstoff verschoben wird, bleiben die Bindungsdistanzen konstant.

Diese Situation ist bekannt von anderen Kristallstrukturen, in denen auch ein Anion in der beta-Phosphatbindungsseite gefunden wurde, wie z. B. der Rac-Tiam-Komplex (Worthy-lake et al., 2000) oder der Ras-Guanosin-Komplex (Scheffzek et al., 1994). Die Tatsache, daß sich ein Polyanion als mutmassliches beta-Phosphat-Mimic, in der Nukleotidbindungstasche befindet, bringt die Frage nach der Reaktionsphase des Komplexes auf. So zeigt die Ran-RCC1-Struktur möglicherweise nicht den Endzustand der Reaktion, sondern bildet ein Zwischenprodukt einer komplexen Austauschreaktion ab, die durch die Sulfatbindung stabilisiert wird.

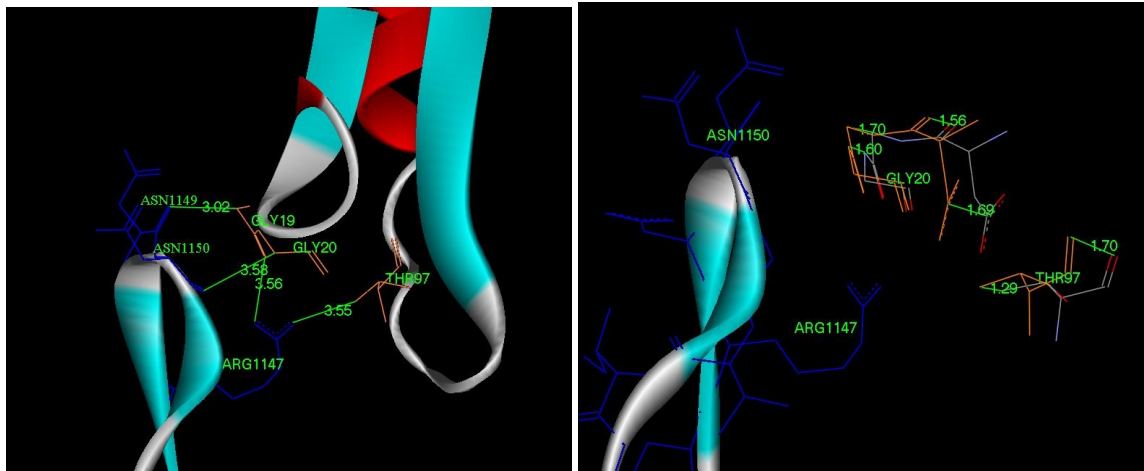
### 3.1.2.4 Relevante Aminosäuren in der Ran-RCC1-Interaktion

Unter Verwendung der Strukturanalyse des Ran-RCC1-Komplexes wurde der Versuch unternommen, die Austauschreaktion zu rekonstruieren. Die in Frage kommenden Bereiche belaufen sich in Ran auf die Switch-II (Ran70-72) Region, den P-Loop (Ran19, 20), die Schleife zwischen beta-Faltblatt-5 und alpha-Helix-4 (RanK130) und alpha-Helix-3 (RanK99, RanW104). In RCC1 sind Bereiche im Blatt 1 (GGQ<sub>HF</sub>-Motiv<sub>407-410</sub>), Blatt 2 (D95, GGMH-Motiv<sub>75-78</sub>), Blatt 3 (extra beta-sheet, D 128), Blatt 4 (G<sub>EQ</sub>Q<sub>X</sub>QLGR-Motiv<sub>199-206</sub>,) und Blatt 6 (G<sub>QE</sub>HH<sub>TS</sub>-Motiv<sub>302-306</sub>) an der Einleitung der Austauschreaktion beteiligt.

#### RCC1 extra beta-sheet B3

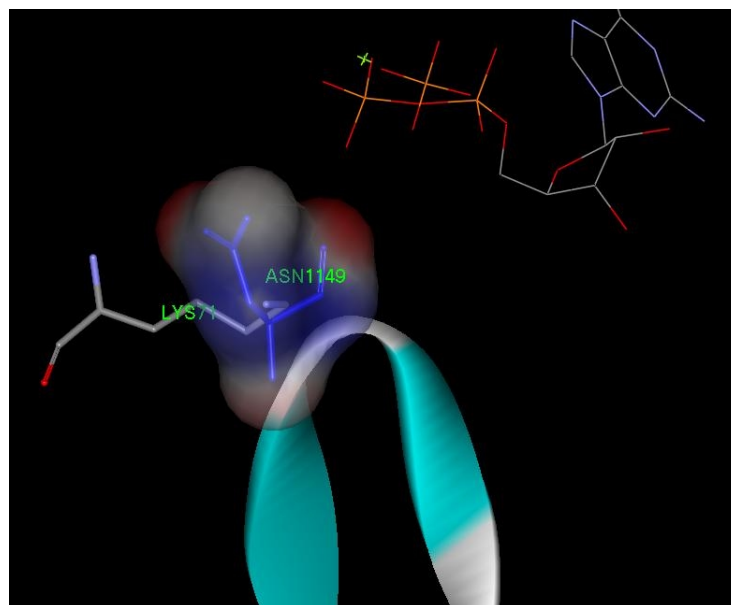
Das auffälligste Element in der RCC1-Struktur ist das hervortretende extra-beta-Faltblatt (AS 146-153), das starr in den Spalt zwischen P-Loop und Switch-II von Ran ragt. Ein möglicher Weg, auf dem dieser Bereich von RCC1 zur Austauschreaktion beiträgt, ist zunächst eine Fixierung an den P-Loop und alpha-Helix-3 von Ran. Hierdurch werden der P-Loop und die alpha-Helix-3 als Einheit um 1,3-1,7 Å in Richtung Nukleotidbindungsseite bzw. in Richtung extra-beta-Faltblatt verschoben (s. Abbildung 16). Die Struktur des P-Loops bleibt hierbei jedoch prinzipiell erhalten. Die Bindung von Ran in diesem Bereich wird über vier verschiedener Aminosäuren vermittelt. Den äußersten Bereich des extra-beta-Faltblatts bilden die Asparagine N149 und das N150. Sie stehen in Kontakt mit P-Loop RanG19 (N149 O mit Ca von RanG19, 3 Å) und RanG20 (N150 O mit Ca von RanG20, 3,5 Å). Die zusätzlichen Interaktionen von N147 mit RanG19 (NH<sub>2</sub> mit O

von RanG19, 3,1 Å) und RanT97 alpha-Helix-3 (NH<sub>2</sub> mit C<sub>G2</sub> von RanT97, 3,5 Å) unterstützen ebenfalls eine Fixierung von Ran an RCC1.



**Abbildung 16: Interaktionen und strukturelle Veränderungen des P-Loops und des extra-beta-Faltblattes.** Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem nukleotidbindenden Bereich der Ran-RCC1-Struktur. **links**) Stabilisierende Interaktionen (grüne Linien) des extra-beta-Faltblattes von RCC1 (blaue Reste) mit Aminosäuren des Ran P-Loops (RanG19 und RanG20; rote Reste) und der alpha-Helix-3 (RanT97). Distanzen sind in Å angegeben. **rechts**) Visualisierung der strukturellen Veränderung (grüne Linien) der mit RCC1 interagierenden Ran-Aminosäuren durch Überlagerung der Ran-GDP-Struktur (mehrfarbig) (Scheffzek et al., 1995). Die Distanzen der unterschiedlichen Positionen sind in Å angegeben. Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLab-Viewer® erstellt.

Neben der Fixierung beeinflusst das Eindringen des extra-beta-Faltblatts einen weiteren Teil von Ran. Switch-II, beteiligt an der Fixierung des Magnesiums, wird ein Stück weit aus dem phosphat- und magnesiumbindenden Bereich verdrängt.



**Abbildung 17: Interaktion von RCC1N149 (extra-beta-Faltblatt) mit RanK71 (Switch-II).** Dargestellt ist das extra-beta-Faltblatt aus der Ran-RCC1-Struktur mit der RCC1-Aminosäure N149 (blau), so wie das RanK 71 (mehrfarbig) und das Nukleotid (mehrfarbig) aus der Ran-GDP-Struktur (Scheffzek et al., 1995). Deutlich ist das Hereinreichen von RCC1N149 in den Interaktionsbereich von RanK71 zu erkennen. Die Abbildung wurde mit dem WebLab-Viewer® erstellt.

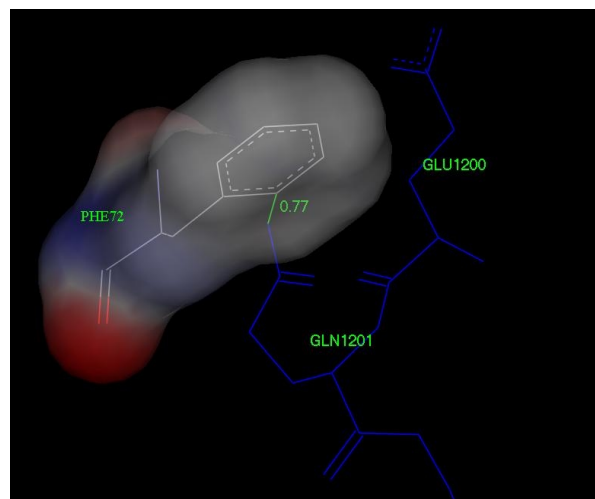
Das aus dem Switch-II kommende RanK71 überlagert in der Ran·GDP-Struktur das RCC1N149 (s. Abbildung 17). Das extra-beta-Faltblatt bewirkt so über N149 eine strukturelle Neuorientierung von RanK71, die aufgrund der beschriebenen Fixierung des P-Loops und alpha-Helix-3 nur in eine Richtung vollzogen werden kann. Die Verschiebung von RanK71 wirkt sich bis ins Aminosäurerückgrad aus und verschiebt so Switch-II.

#### **RCC1 G<sub>EQ</sub>Q<sub>X</sub>QLGR-Motiv<sub>199-206</sub> in Blatt 4**

Durch das konservierte G<sub>EQ</sub>Q<sub>X</sub>QLGR-Motiv kommt es zu einem weiteren entscheidenden Einfluß auf Switch-II, eine sterische Kettenreaktion, die sich bis in den nukleotidbindenden Bereich auswirkt.

Dieses Motiv steht in direktem Kontakt zu Switch-II. Die Überlagerung des Komplexes mit der Ran·GDP-Struktur zeigt, daß die Positionen von RCC1Q201 und RanF72 (Distanz 0,77 Å) zu sterischen Problemen führt (s. Abbildung 18). Das NH<sub>2</sub> von Q201 ragt in den Benzolring des Phenylalanins, so daß dieser umorientiert werden muß.

Das G<sub>EQ</sub>Q<sub>X</sub>QLGR-Motiv<sub>199-206</sub> wird durch eine Reihe von Interaktionen zwischen Haupt- und Seitengruppen und zudem durch eine in unmittelbarer Nähe befindliche extra alpha-Helix, die in den sehr gleichförmig strukturierten RCC1 Blättern nur in Blatt 4 vorkommt, stabilisiert, wodurch dieses Motiv insgesamt sehr kompakt und starr wirkt (stabilisierende Wechselwirkungen: Q201-Q203, G202-G199, G197-L223, P208-A212, K206-K222). Die Lösung des sterischen Konfliktes zwischen RCC1Q201 und RanF72 wird daher durch eine Umorientierung des RanF72 gelöst. Die Ran·RCC1-Komplexstruktur zeigt im Vergleich mit der Ran·GDP-Struktur, daß RanF72 eine Verschiebung um bis zu 5,8 Å erfährt.

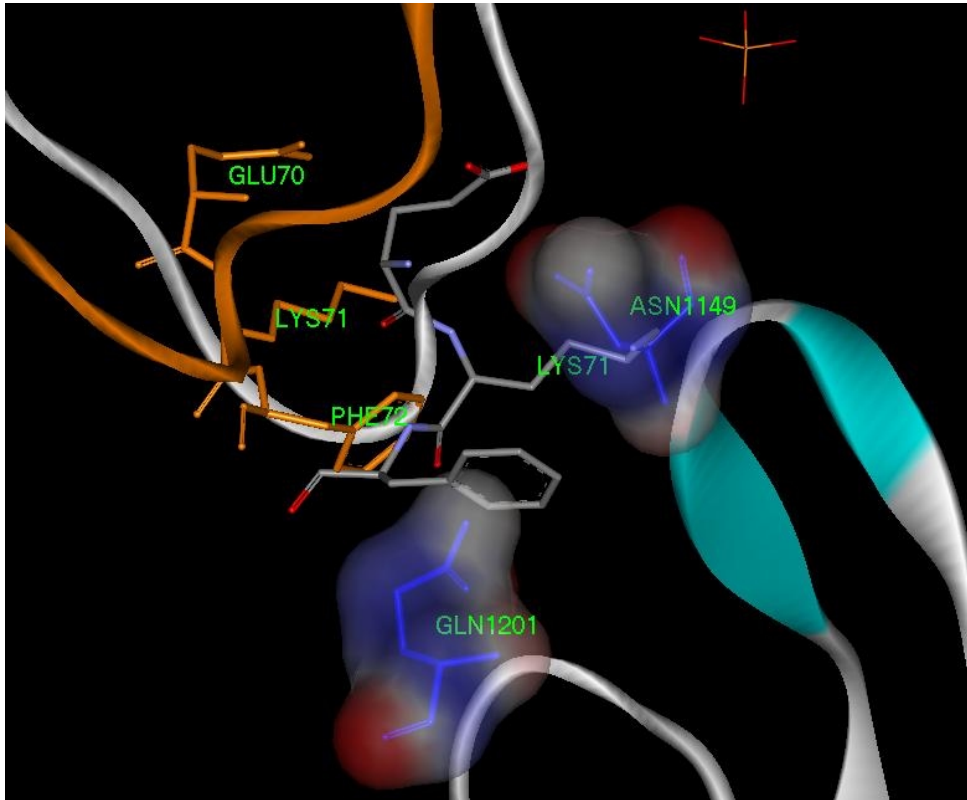


**Abbildung 18: Interaktion von RCC1Q201 (G<sub>EQ</sub>Q<sub>X</sub>QLGR-Motiv<sub>199-206</sub>) mit RanF72 (Switch-II).** Dargestellt sind die RCC1-Aminosäuren E200 und Q201 (blau) aus der Ran·RCC1-Struktur und RanF72 (mehrfarbig und Oberflächendarstellung) aus der Ran·GDP-Struktur (Scheffzek et al., 1995). Deutlich ist das Hereinreichen von RCC1Q201 in den Interaktionsbereich von RanF72 zu erkennen. Die grüne Linie zeigt die geringste Distanz (Å) zwischen RCCQ201 und RanF72.



### RanE70, RanF72 und Switch-II

F72<sup>R</sup> wird durch Q201 in eine neue Position gebracht, die in den van der Waals-Radius des E70<sup>R</sup> hinein ragt. Es kommt zu einer Verlagerung von E70<sup>R</sup> um bis zu 6 Å. Die veränderte Position von E70<sup>R</sup> ist jedoch nicht allein als Folge des F72<sup>R</sup> und somit des Q201 zu sehen, vielmehr handelt es sich um ein additives Resultat aus der Rückgratverschiebung von Switch-II, bewirkt durch den Einfluss von N149 (s. Abbildung 19).



**Abbildung 19: Strukturelle Veränderungen von Switch-II durch den Einfluss des extra-beta-Faltblattes und des G<sub>EQ</sub>Q<sub>X</sub>QLGR-Motives<sub>199-206</sub>.** Dargestellt ist das extra-beta-Faltblatt mit der Aminosäure N149 (blau), das G<sub>EQ</sub>Q<sub>X</sub>QLGR-Motiv<sub>199-206</sub> mit Aminosäure E200 und Q201 (blau) und Switch-II (rot) mit RanE70 und RanF72 aus der Ran-RCC1-Struktur. Durch die Überlagerung von Switch-II mit RanE70 und RanF72 (mehrfarbig) aus der Ran-GDP-Struktur (Scheffzek et al., 1995) wird die veränderte Position dieses Bereichs deutlich. Die Grüne Linie zeigt die Verschiebung des Rückgrats an der Position von RanE70 und die Distanz (Å). Die Abbildung wurde mit dem WebLab-Viewer® erstellt.

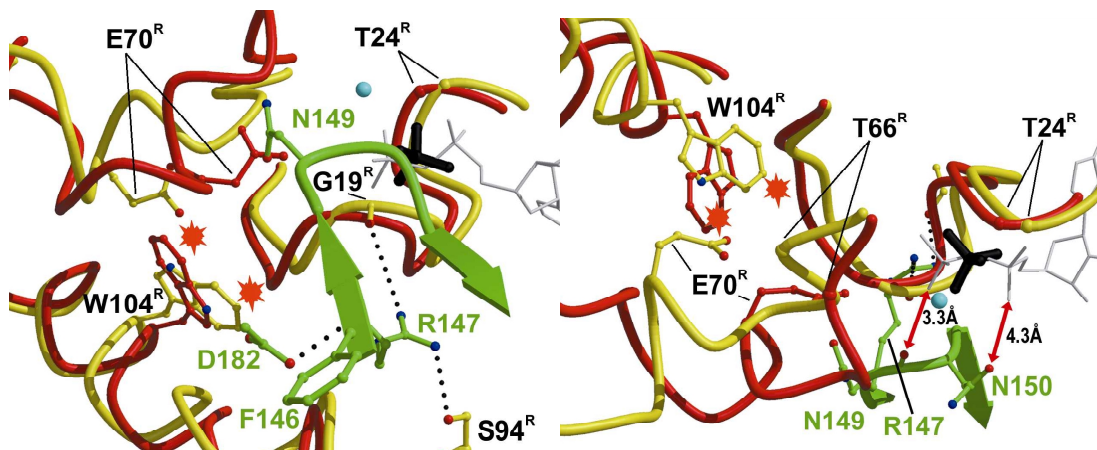
Die Rückgratverschiebung zeigt sich auch in den Positionen von RanE70 und RCC1N149 in den unterschiedlichen Komplexen. Es kommt zu einer Verschiebung von jeweils 4 Å.

Die Umorientierung von RanE70 wirkt sich wiederum auf die Position von RanW104 aus. Es kommt zu einer Drehung des RanW104 um 180°, die es näher zum RanD18 bringt und dadurch die Verschiebung des P-Loops in Richtung Nukleotidbindungsseite bzw. in Richtung extra-beta-Faltblatt unterstützt. Wahrscheinlich ist auch, daß RanW104 die gezielte Verschiebung von Switch-II unterstützt, denn alpha-3 (95-110) wird durch die Interaktion mit RCC1 über RanK99 (s. u.) in Richtung RanE70 verschoben. Diese Bewegung limitiert die Ausweichmöglichkeit von RanW104 gegenüber RanE70, was zur Folge hat, daß Switch-II weiter nach außen verdrängt wird.

### RanW104 alpha-3

RanW104 wird über alpha-Helix-3 angehoben und so durch die Interaktion mit RanE70 zwischen P-Loop und Switch-II geschoben. Dadurch unterstützt es die P-Loop-Verlagerung zur Nukleotidbindungsseite bzw. in Richtung extra-beta-Faltblatt von RCC1.

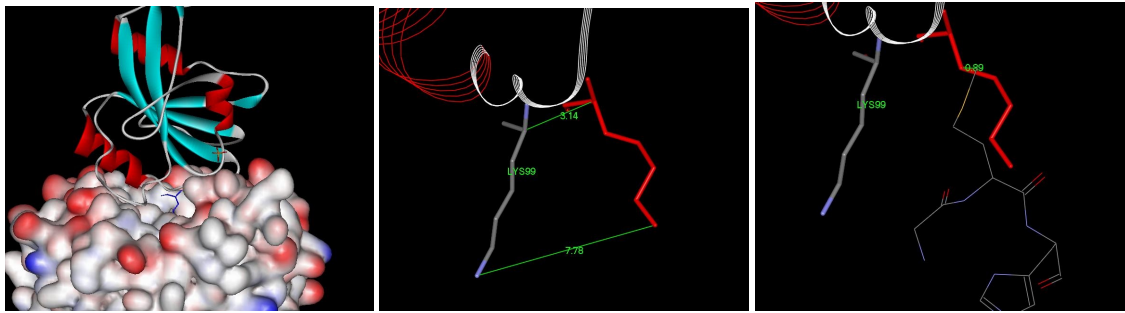
RanW104 und RanD18 haben sowohl in der reinen GDP als auch in der Komplexform einen Abstand von 3,4 Å. In der Überlagerung aus dem Komplex und Ran-GDP ist der Abstand von RanW104 (Ran-GDP) 1,9 Å zu RanD18 aus der Komplexstruktur mit RCC1. Das gilt auch für die Position von RanD18 zum beta-Phosphat bzw. zum  $\text{SO}_4^{2-}$ . Der Abstand ist in beiden Fällen 3,7 Å (s. Abbildung 20).



**Abbildung 20: Strukturelle Veränderungen von RanE70 (Switch-II) und RanW104 (alpha-Helix-3) durch die Ran-RCC1-Komplexbildung.** Dargestellt ist das extra-beta-Faltblatt mit der Aminosäure N149 (grün), alpha-Helix-3 mit RanW104 und RanS94 (rot), der P-Loop und Switch-II (rot) mit RanE70 aus der Ran-RCC1-Struktur. Durch die Überlagerung der selben Ran-Elemente aus der Ran-GDP-Struktur (gelb) (Scheffzek et al., 1995) wird der sterische Konflikt (rote Sterne) zwischen RanE70 und RanW104 deutlich. Die roten Linien zeigen Abstände (Å) zwischen dem Nukleotid (grau) aus der Ran-GDP-Struktur und extra-beta-Faltblatt. Die Abbildung rechts ist um 90° gedreht (Renault et al., 2001).

### RanK99 alpha-Helix-3<sub>95-110</sub>, RanK130<sub>Schleife 122-137</sub> und RCC1D95<sub>Blatt 3</sub>

Das herausgestreckte RanK99 ist u. a. für die Anhebung der nachfolgenden Aminosäurereste der alpha-Helix-3 mitverantwortlich, die sich auch auf RanW104 auswirkt. Die Überlagerung mit der Ran-GDP Form zeigt, daß sich sterische Probleme mit dem stark konservierten GGMH-Motiv<sub>75-78</sub> von RCC1 ergeben. Durch die Neuorientierung von RanK99 sind diese sterischen Probleme jedoch nicht mehr vorhanden. Das RanK99 wird um ca. 45° gedreht und alpha-Helix-3 nach „oben“ verschoben. Die korrekte Position von RanK99 und damit alpha-Helix-3 wird durch eine Fixierung des Rückgratsauerstoff und des Stickstoffatoms über eine Bindung mit den streng konservierten Aminosäuren RCC1Q409 und RCC1D128 gewährleistet. Die Interaktion zeigt sich in der Gesamtstruktur als eine Art Verankerung in RCC1.



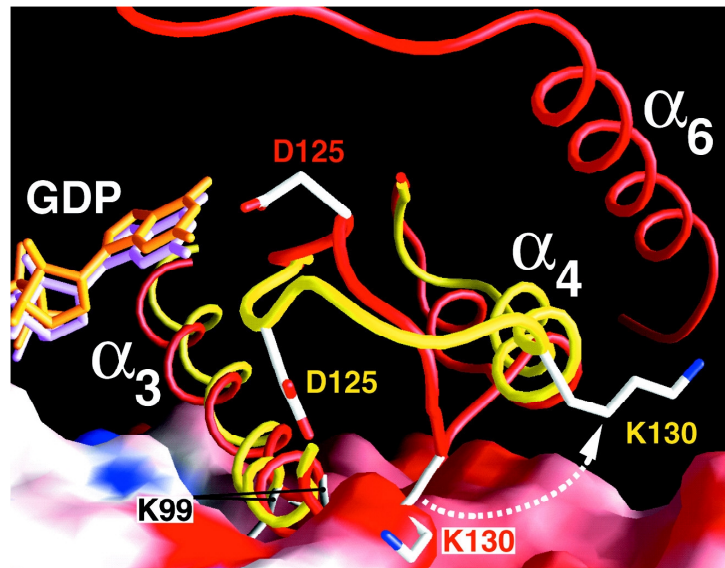
**Abbildung 21: Strukturelle Veränderungen von RanK99 (alpha-Helix-3) durch die Ran·RCC1-Komplexbildung.** links) Oberflächendarstellung von RCC1 im Komplex mit Ran (Rückgratdarstellung) aus dem Ran·RCC1-Komplex. Das RanK99 (blau) ragt in den RCC1-Tunnel hinein (s. hierzu auch **Abbildung 14**). Mitte) Sterischer Konflikt zwischen dem konservierten GGMH-Motiv<sub>75-78</sub> (mehrfarbig dünn; aus dem Ran·RCC1-Komplex) und RanK99 (rot; aus der Ran-GDP-Struktur). Im Ran·RCC1-Komplex besteht kein Kontakt zwischen dem GGMH-Motiv<sub>75-78</sub> und RanK99 (grau/blau). rechts) Zeigt die Distanz (Å) der Verschiebung von RanK99 aus der Ran-GDP-Struktur (rot) und dem Ran-RCC1-Komplex (grau/blau) an zwei Stellen. Die Abbildung wurde mit dem WebLab-Viewer® erstellt.

RanK99 fungiert so auch als Fixierungspunkt (Justierung), vergleichbar der Bindung des extra beta-Faltblattes von RCC1 (R147, N149, G151) an den Ran P-Loop (D19, D20) und an die alpha-Helix-3 (T97). Bei der eine Fixierung von Ran genutzt wird, um Switch-II zu verdrängen.

Die Bedeutung und vergleichbare Funktionsweise dieser Verankerung wird weiter deutlich durch die Interaktionen des Ran Bereiches zwischen beta-Faltblatt-5 und alpha-Helix-4 (von 122 bis 137), insbesondere RanK130, mit dem konservierten D95 aus RCC1. Das Lysin 130<sup>R</sup> in der GDP-Form zeigt sterische Überlagerungen mit dem RCC1 Aspartat 95. Durch die Interaktion mit dem Austauschfaktor erfährt der Bereich zwischen beta-Faltblatt-5 und alpha-Helix-4 eine starke Dispositionierung und wird flexibel. Diese Veränderung wirkt sich bis in das Nukleotidbindungsmotiv NKxD<sub>122-125</sub> aus, was so die Nukleotidfreisetzung unterstützt.

Das Aspartat 95 befindet sich im konservierten G<sub>X</sub>ND<sub>XX</sub>ALGR<sub>X</sub>T<sub>92-113</sub>-Motiv und liegt im Ran·RCC1-Komplex dem RanK130 gegenüber. Seine Position wird vergleichsweise gering verändert, da es ähnlich wie das G<sub>EQ</sub>Q<sub>X</sub>QLGR-Motiv<sub>199-206</sub> in Blatt 4 durch eine Reihe von Interaktionen zwischen Haupt- und Seitengruppen mit den es umgebenden Resten stabilisiert wird. Hierdurch wird ein Ausweichen von D95 verhindert und eine Verlagerung von RanK130 ist die Folge (s. Abbildung 22). Zusätzlich ist D95 in die Bindung von RanT93, RanS94 und RanR95 involviert, was unterstützend auf die Fixierung der Ran alpha-Helix-3 wirkt. Die Fixierung von Ran und die Steifheit der RCC1-Struktur ermöglichen so auch in diesem Bereich die Verdrängung eines für die Nukleotidbindung wichtigen Elements.





**Abbildung 22: Strukturelle Veränderungen von RanK130 durch die Interaktion mit RCC1R95.** Dargestellt ist die Basenbindende Region der Ran-GDP-Struktur (rot) und der gleiche Bereich aus der Ran-RCC1-Struktur (Ran: gelb; RCC1: Oberflächendarstellung). Zu erkennen ist die Neuorientierung der Schleife von Aminosäure 122 bis 137 und mit ihr RanD125 aus dem NKxD-Motiv<sub>122-125</sub> durch den sterischen Konflikt zwischen RCC1D95 (innerhalb der Oberflächenstruktur) und RanK130 (aus Renault et al., 2001).

### 3.1.3 Ran und RCC1 Mutanten

Für die kinetische Untersuchung an Ran und RCC1 wurde Wildtyp- und Mutanten- Protein bakteriell synthetisiert. Voruntersuchungen konnten zeigen, daß das in *E. coli* rekombinat generierte Ran- und RCC1-Protein in der gleichen Weise aktiv ist, wie die aus HeLa-Zellen isolierten Proteine (Klebe et al., 1995b).

#### 3.1.3.1 Aus der Interaktionsanalyse hervorgegangene Mutanten

Aus der vorangegangenen Strukturanalyse waren für Teilschritte des RCC1-katalysierten Nukleotidaustausches an Ran relevante Aminosäuren bzw. Strukturbereiche hervorgegangen. Um den Einfluss der entsprechenden Aminosäuren auf die Nukleotidaustauschreaktion ermitteln zu können, wurden Alanin und Deletionsmutanten generiert: RanE70A, RanF72A, RanK99A, RanW104A, RanK123A, RanD125A, RanK130A, RCC1D95A, RCC1N149A, RCC1d148d151, RCC1E200A, RCC1Q201A, RCC1R217A.

Die Ran- bzw. RCC1-Mutanten können aufgrund ihrer Interaktion oder Lokalisation in Gruppen zusammengefasst werden.

Aminosäuren mit Einfluss auf den magnesium- und phosphat-bindenden Bereich: RCC1E200 und RCC1Q201 liegen dem Switch-II-Bereich von Ran gegenüber und verdrängen diesen aus der nukleotidbindenden Region. Auf Switch-II befinden sich RanE70 und RanF72. RanE70 interagiert nach dem Einfluss von RanF72 initiiert durch RCC1Q201 mit RanW104, wodurch RanW104 die Switch-II-Verschiebung unterstützt und eine P-Loop Verdrängung bewirkt. Das extra-beta-Faltblatt von der RCC1-Aminosäure

146 bis 154 bindet an den P-Loop (RCC1R147, RCC1N149 und RCC1N150) und unterstützt die Verdrängung von Switch-II über RCC1N149.

Aminosäuren mit Einfluss auf den basen- und ribose-bindenden Bereich des Nukleotids: RCC1D95 interagiert mit RanK130 und verdrängt dadurch die Schleife<sub>122-137</sub>, die sich bis in das NKxD-Motiv<sub>122-125</sub> von Ran erstreckt, das die Base und die Ribose bindet. RanK99 ragt in den von RCC1 gebildeten Tunnel und fixiert Ran an RCC1. Es ermöglicht so die Verdrängung der Ran-Schleife<sub>122-137</sub> durch RCC1D95.

RCC1R217A wurde aufgrund seiner starken Konservierung mit in die Untersuchung einbezogen.

### 3.1.3.2 RanV45I in Switch-I

Die GTPase Ran ist das einzige bekannte Mitglied der Ras-Superfamilie, das im Kern zu finden ist und dort die Aufgabe des Kerntransports übernimmt. Von dieser Funktion unabhängig konnte ihr eine Rolle bei der Spindelformation und sogar als mitotischer Spindelcheckpoint zugeordnet werden. Die Spindelformation konnte in *Xenopus* (Kalab et al., 1999) oder in *S. pombe* am Hefehomolog SpRan zunächst anhand von *in vitro*-Experimenten gezeigt werden. Die nachfolgende *in vivo*-Analyse zeigte bei normalem Kerntransport Defekte im mikrotubulären Zytoskelett bei einer SpRan Mutante (Fleig et al., 2000). Die Defekte äußerten sich in Chromosomenmissegregation und abnormaler Zellteilung. Diese Formen werden ebenfalls durch mikrotubulidestabilisierende Mittel, die Spindel-Checkpoint-Negativmutante Mph1p und durch Mutationen in dem Spindelpolprotein Cut11p hervorgerufen. Die SpRan-Mutante kann durch Überexpression von Mal3p (Beinhauer et al., 1997) suprimiert werden. Daher wird vermutet, daß SpRan eine Rolle bei der Mikrotubulistabilität übernimmt. Die Mutation in Ran, die diese Aberration hervorruft, ist eine Punktmutation, die homolog im humanen Ran einem Valin-Isoleucin-Wechsel der Aminosäure 45 entspricht. Angeregt durch eine Korrespondenz mit Shelley Sazer, die die oben genannten Untersuchungen leitete (s. hierzu Fleig et al., 2000), wurde diese Mutation für das humane Ran übernommen und ebenfalls in die folgenden Untersuchungen eingebracht. Erhaltene Daten sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit diese Mutation Einfluss auf den Kerntransport und beteiligte Faktoren hat.

### 3.1.3.3 Expression und Aufreinigung

#### Ran



**Abbildung 23: Expression von rekombinantem RanE70A in *E. coli* BL21 (DE3).** Ionenaustauscher-Chromatographie mit aufsteigenden KCl-Gradienten. Analyse durch eine SDS-Gelelektrophorese. a) SDS-7 Marker b) Aufschluß c) Durchlauf d) gesammelte RanE70A Fraktionen (24 kDa).

Das im Labor verfügbare Ran-Gen befindet sich in einem IPTG-induzierbaren pET3d-Vector, einem pBR322-Derivat. Für die Expression der Proteine wurde das Plasmid in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert. Sowohl für Wildtyp-Ran (Klebe et al., 1995a) als auch für die verschiedenen Ran-Mutanten wurde dieses Expressionssystem verwendet.

GST-Ran befindet sich im pGEX-Vektor®, der ebenfalls durch die Zugabe von IPTG induziert werden kann und für die Expression in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert wurde.

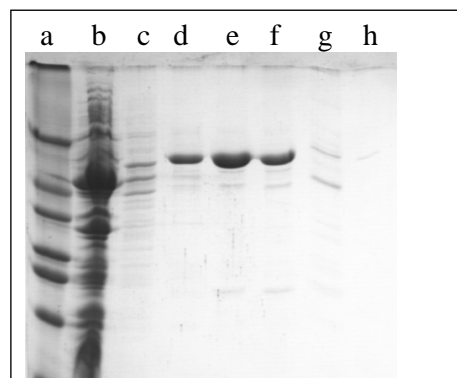
Aus zehn Litern Kulturmedium konnten für Ran, Ran-Mutanten und GST-Ran nach der Inkubation jeweils ca. 18-20 g Zellen (Nassgewicht) erhalten werden. Der Zellaufschluss erfolgte durch ein effizientes mechanisches Druckverfahren, den Microfluidizer (Microfluidics, USA). Hier wird die Zellsuspension aus einem Vorratsgefäß angesaugt, in zwei Ströme geteilt und mit einem Druck von 600 bar in einer Kammer wieder zusammengeschoßen. Als Folge wird die Zellwand zerstört und die Zellen öffnen sich. Nach der Reinigung durch eine Kationenaustauscher-Chromatographie (Fractogel-100-Säule) in Gegenwart von 10  $\mu$ M GDP (s. Abbildung 23) und einer anschließenden Ammoniumsulfatfällung, die durch eine schonende Präzipitation eine Volumenreduzierung und eine zusätzliche Aufreinigung erreicht, wurde das Protein in Kalium-Phosphat-Puffer resuspendiert und eine Konzentrationsbestimmung mittels Bradford durchgeführt. Aus einem Ansatz konnten jeweils die folgenden Mengen Protein erhalten werden.

**Tabelle 3: Ran-Gesamtproteinmengen nach der Aufreinigung.**

Ran	Proteinkonzentration nach der Aufreinigung in mg/10g Zellen (Nassgewicht)
Ran-Wildtyp	80
RanV45I	66
RanE70A	30
RanF72A	57
RanK99A	100
RanW104A	12
RanK123A	Keine Expression
RanD125A	Keine Expression
RanK130A	51
GST-Ran	120

Gesamtproteinbestimmung durch die Methode von Bradford nach der Aufreinigung aus 10g Zellen (Nassgewicht) *E. coli*-BL21(DE3)-Kultur.

## RCC1



**Abbildung 24: Expression von rekombinantem RCC1N149A in *E. coli* CK<sub>600</sub>K.** Aufreinigung durch eine SP-Sepharose-Säule und anschließende Analyse durch eine SDS-Gelelektrophorese. a) SDS-7 Marker b) Aufschluß c-h) gesammelte Fraktionen d-f) zeigen das RCC1N149A-Protein (45kDa).

Die RCC1-cDNA befindet sich in einem pTAC-Vector (Klebe et al., 1995a), bei dem es sich ebenfalls um ein Derivat des pBR322 (deBoer et al., 1983) Vektors handelt. Das Plasmid wurde für die Expression in *E. coli* CK<sub>600</sub>K-Zellen transformiert, bei dem die Expression des RCC1-Gens auch durch IPTG-Induktion erreicht wird.

Sowohl für Wildtyp-RCC1 als auch für die verschiedenen RCC1-Mutanten wurde dieses Expressionssystem verwendet. Hier konnten aus zehn Litern Kulturmedium nach der Inkubation ebenfalls ca. 18-20 g Zellen (Nassgewicht) erhalten werden. Nach Zellaufschluss mit Hilfe des Microfluidizers (Microfluidics, USA) wurde eine Reinigung durch

eine Kationenaustauscher-Chromatographie (SP-Sepharose-Säule) (s. Abbildung 24) und eine anschließende Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Durch anschließendes Resuspensieren in Hepes-Puffer, war eine Konzentrationsbestimmung mittels Bradford und so eine Bestimmung der Proteinausbeute möglich. Aus einem Ansatz konnten jeweils die folgenden Mengen Protein erhalten werden.

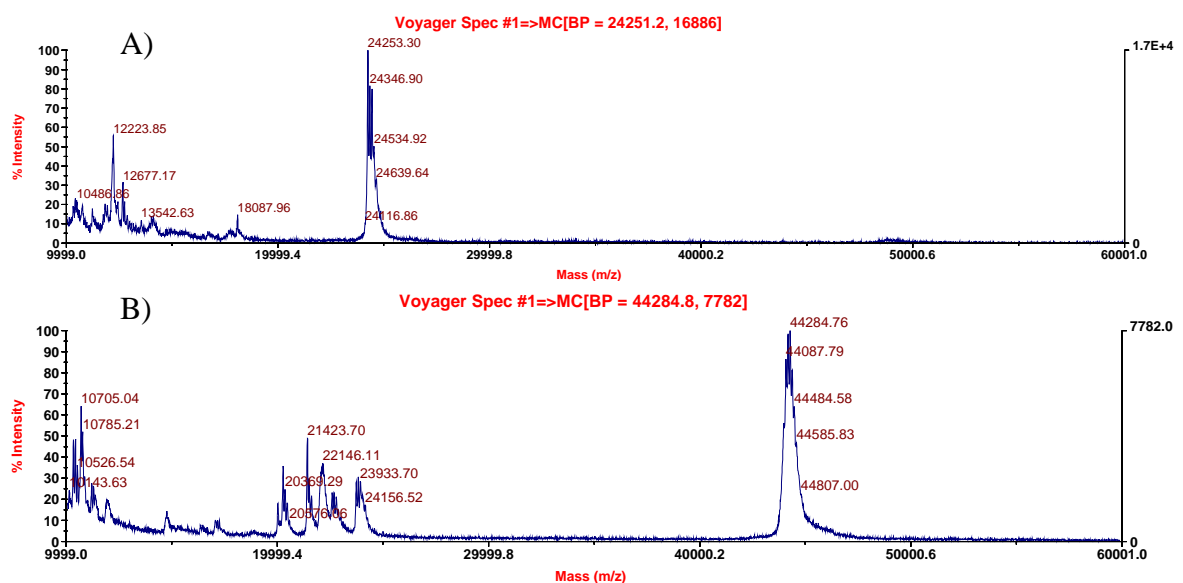
**Tabelle 4: RCC1 Gesamtproteinmengen nach der Aufreinigung.**

RCC1	Proteinkonzentration nach der Aufreinigung in mg/10g Zellen (Nassgewicht)
RCC1-Wildtyp	120
RCC1D95A	88
RCC1N149A	122
RCC1d148d151	73
RCC1E200A	84
RCC1Q201A	90
RCC1R217A	76

Gesamtproteinbestimmung durch die Methode von Bradford nach der Aufreinigung aus 10L *E. coli*-CK<sub>600</sub>K-Kultur.

### 3.1.3.4 Massenspektroskopie

Die Massenspektroskopie wurde als zusätzliche Kontrolle der rekombinanten Ran-bzw. RCC1-Klone verwendet. Neben den aus denaturierender SDS-Proteingelelektrophorese abgeschätzten Molekulargewichten war es so möglich, genauere Massen der einzelnen Mutanten zu erhalten. In Abbildung 25 ist exemplarisch das Massenspektrum einer Ran- und einer RCC1-Mutante dargestellt.

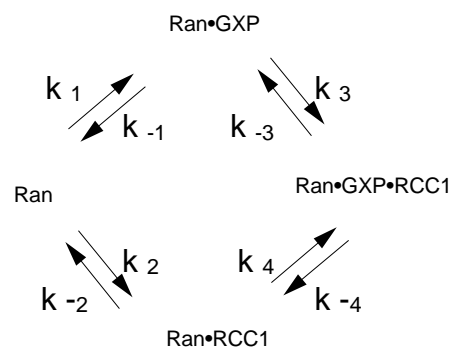


**Abbildung 25: Massenspektrum von A) RanK130A und B) RCC1D95A.** Maldi-MS Massenspektrum des isolierten RanK130A-Proteins.

### 3.1.4 Biophysikalische Interaktionsmessung

Die verschiedenen Ran- und RCC1-Konstrukte wurden nun in der biophysikalischen Interaktionsanalyse eingesetzt. Diese sollte detaillierte Aufschlüsse über die Rolle einzelner Aminosäuren in der RCC1-katalysierten Reaktion des Nukleotidaustausches von Ran geben, um hieraus unter Einbeziehung der strukturell zugänglichen Daten ein Modell zum GEF-Austauschmechanismus von Ran und RCC1 zu erhalten.

Ein kinetisches Modell, das den komplexen Ablauf der Austauschreaktion beschreibt, konnte bereits durch vorherige Untersuchungen erstellt werden (Klebe et al., 1995a).



**Abbildung 26: Minimales Modell für die Interaktion zwischen Ran, RCC1 und GXP**

Das Modell zeigt, daß Ran sowohl das Guaninnukleotid GXP (GDP oder GTP) ( $K_1 = k_1/k_{-1}$ ) als auch RCC1 ( $K_2 = k_2/k_{-2}$ ) binden kann. Beide Formen können als stabile Komplexe isoliert werden (Bischoff und Postngl, 1991; Klebe et al., 1993). Die Interaktion von Ran•GXP mit RCC1 wird durch zwei Gleichgewichte beeinflusst, die zur Bildung des ternären Komplexes und zur Dissoziation des GXP von Ran führen:

$$-\frac{d[\text{Ran}\cdot\text{GXP}]}{dt} = k_1 [\text{Ran}] [\text{GXP}] - k_{-1} [\text{Ran}\cdot\text{GXP}] + k_{-3} [\text{Ran}\cdot\text{GXP}\cdot\text{RCC1}] - k_3 [\text{Ran}\cdot\text{GXP}]$$

Gleichung 17

Die Nukleotidaustauschrate ist das Ergebnis zweier voneinander unabhängiger Reaktionen. Zum einen die durch  $k_{-4}$  beschriebene stimulierte GXP-Dissoziation und zum anderen die intrinsische GXP-Dissoziation, beschrieben durch  $k_{-1}$ .

Diese Reaktion verläuft im Sinne einer enzymatischen Reaktion, wenn ein Überschuss an freiem Nukleotid und RCC1 zur Verfügung steht. Die RCC1-katalysierte Nukleotidfreisetzungreaktion wird dann durch das vorgelagerte Gleichgewicht ( $K_3$ ) und die Dissoziation des ternären Komplexes ( $k_{-4}$ ) Beeinflusst. Die Bildung des binären Komplexes ( $k_1$ ) kann aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit vernachlässigt werden. Ebenfalls kann prinzipiell die intrinsische Nukleotiddissoziation ( $k_{-1}$ ) ohne größere Fehler vernachlässigt werden, da  $k_{-1}$  mindestens um den Faktor 1000 kleiner ist als  $k_{-4}$  (Klebe et al., 1995b).

#### **3.1.4.1 Fluoreszenzmessung des RCC1-katalysierten Nukleotidaustausch**

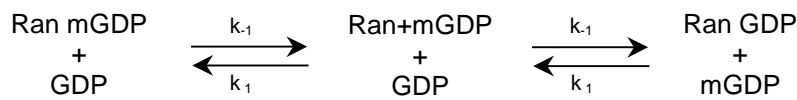
Für die Messung der intrinsischen sowie für die RCC1-katalysierte Nukleotidaustauschreaktion wurden die verschiedenen Ran-Proteine mit einem modifizierten Guaninnukleotid beladen, das an der 2'- bzw. 3'-Hydroxylgruppe der Ribose (Isomerengemisch) eine N-Methylantraniloyl-Gruppe (mant) als Fluorophor trägt. Dieses fluoreszenzmarkierte Nukleotid eignet sich als Substratanaloga für viele Enzyme (Hiratsuka, 1983). Die Fluoreszenz dieser mant-Gruppe wurde bei 350 nm angeregt (Excitation) und bei 440 nm detektiert (Emission). In der Stopped-Flow-Apparatur wurde ein Kantenfilter (KV408 nm) verwendet. Frei in Lösung befindliche mant-Guaninnukleotide zeigen wegen der polaren Umgebung ein schwächeres Fluoreszenzsignal als proteingebundene. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die intrinsische und RCC1-katalysierte Dissoziationsgeschwindigkeit von Guaninnukleotiden an Ran zu bestimmen. Die verschiedenen Ran-Proteine wurden in der GDP-gebundenen Form aus *E. coli* erhalten. Da die Art des Nukleotids (mGDP oder mGTP) die Affinität zwischen Ran und RCC1 nur gering beeinflusst, wurde das proteingebundene GDP gegen mGDP ausgetauscht. Das unmarkierte GDP konnte bei den einzelnen Ran-Mutanten mit Ausnahme von RanW104A, bei der kein Austausch möglich war, zu 75%-90% gegen das fluoreszenzmarkierte mGDP ausgetauscht werden. HPLC-Untersuchungen zeigten, daß schon das aufgereinigte RanW104A Protein, im Gegensatz zu den übrigen Ran-Mutanten, kein Nukleotid gebunden hatte. Nukleotidfreies Ran ist erfahrungsgemäß instabil und fällt nach einigen Stunden als Präzipitat aus. Eine Präzipitierung des Proteins konnte jedoch nach 16 h bei 20 °C nicht festgestellt werden.

#### **Experimentelle Bestimmung von $k_{-1}$ (intrinsische Nukleotiddissoziation)**

Die Bestimmung der intrinsischen Nukleotiddissoziationsrate wurde genutzt, um den Einfluß der jeweils eingeführten Mutationen in Ran auf  $k_{-1}$  zu untersuchen. Ran-mGDP (2  $\mu$ M) wurde hierfür im Fluoreszenzspektrometer mit einem 100fachen Überschuß unmarkierten GDP vermessen. Das unmarkierte Nukleotid verhindert aufgrund des hohen Überschuss eine Reassoziaton des fluoreszenzmarkierten Nukleotids und ermöglicht so die Detektion der Fluoreszenzabnahme nach Dissoziation des mant-Nukleotids.

Vor Abschluss der Messung wurde dem Ansatz eine katalytische Menge RCC1 zugesetzt, um eine Endpunktbestimmung durchführen zu können. Aufgrund der geringen

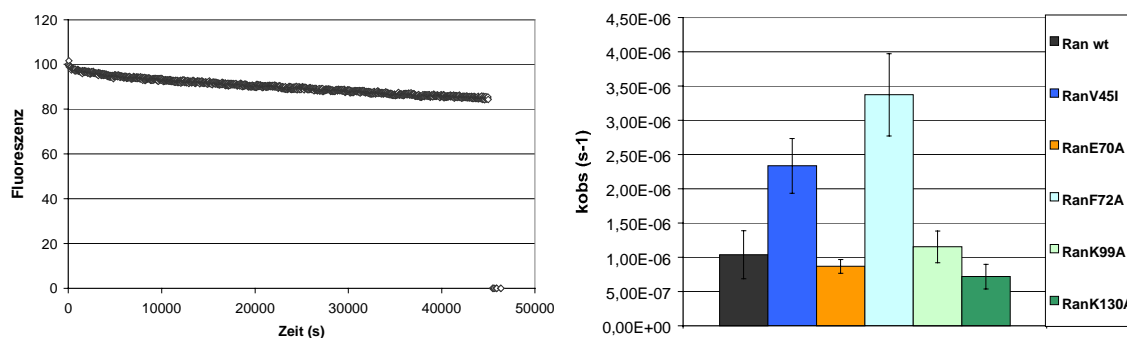
intrinsischen Nukleotiddissoziationsrate konnte selbst nach 16stündiger Messzeit für alle vermessenen Mutanten nur eine geringe Amplitudenänderung festgestellt werden. Die Endpunktbestimmung war daher notwendig, um die Amplitude der Gesamtreaktion abzuschätzen und als Parameter in die mono-exponentielle Anpassung der Messdaten einzubringen.



$$\frac{d[\text{Ran mant GDP}]}{dt} = -k_{-1} [\text{Ran mant GDP}]$$

$$[\text{Ran mant GDP}]_{t=t} = [\text{Ran mant GDP}]_{t=t_0} \exp(-k_{-1} t)$$

Gleichung 18



**Abbildung 27: Intrinsische Dissoziation von Ran·mGDP.** Die Dissoziation von 2  $\mu$ M Ran·mGDP wurde mit einem 100fachen Überschuß freiem, unmarkiertem Nukleotid verfolgt. Durch Zugabe von 10  $\mu$ M RCC1 wurde der Endpunkt der Reaktion bestimmt. links) normierte, intrinsische Nukleotiddissoziation an Ran-Wildtyp. rechts) Vergleich der beobachteten Nukleotiddissoziationsgeschwindigkeiten der verschiedenen Ran-Mutanten. Die Messung wurde bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5 durchgeführt. Anregung: 350 nm, Emission: 450 nm.

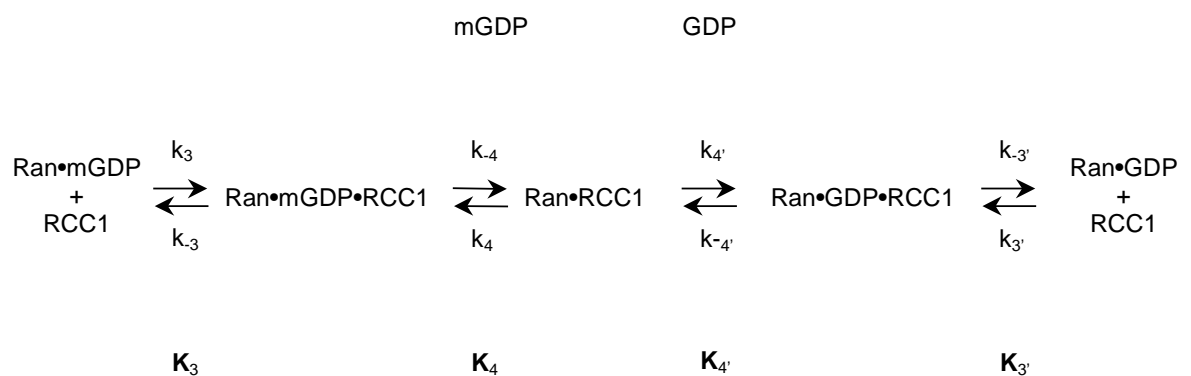
Der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten ist aufgrund der in der Messung erhaltenen geringen Amplituden nur als Richtwert zu betrachten (s. Abbildung 27). Er zeigt lediglich, daß die spontane Nukleotiddissoziation der Ran-Mutanten gegenüber Ran-Wildtyp nur in geringem Maße verändert war, so daß die nachfolgenden Untersuchungen direkt vergleichend mit dem Wildtyp durchgeführt werden konnten (maximal um den Faktor 3,2 bei RanF72A). Eine Ausnahme bildete hier RanW104A, da dieses Konstrukt nicht mit Nukleotid beladen werden konnte.



## Transientenkinetik der Interaktion von Ran-GDP und RCC1

### Effekt ausgewählter Mutationen auf die Nukleotidaustauschreaktion

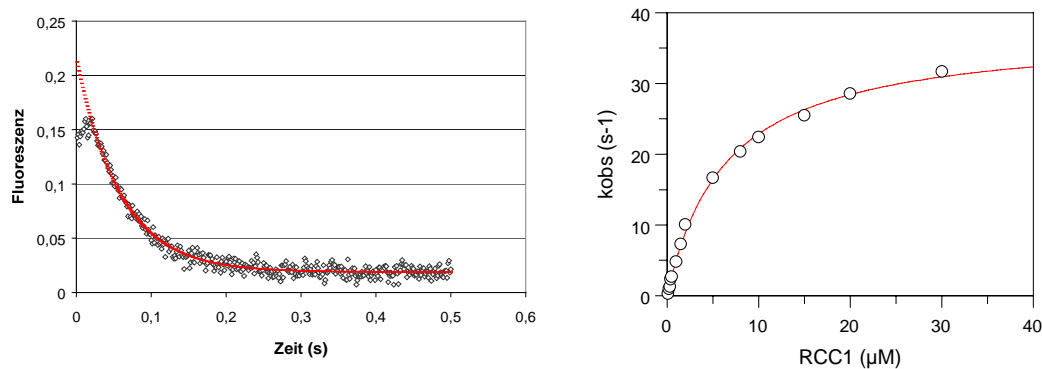
In einem ersten Schritt wurde die katalytische Aktivität der jeweiligen Ran- bzw. RCC1-Konstrukte in der eigentlichen Austauschreaktion verfolgt. Für die experimentelle Bestimmung der RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran ( $k_{\text{obs}}$ ) wurden Zeitkurven der Nukleotiddissoziation bei konstanter Ran-mGDP- und freier Nukleotidkonzentration unter Variation der RCC1-Konzentration mit Hilfe des Stopped-Flow oder einem Fluoreszenzspektrometer gemessen. Der Einsatz beider Techniken war aufgrund unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeiten notwendig. Schnelle Kinetiken wurden im Stopped-Flow vermessen, während das Fluoreszenzspektrometer für langsame Kinetiken mit Halbwertszeiten im Minutenbereich (z.B. RCC1D95A) eingesetzt wurde. Das Prinzip basiert in beiden Messverfahren auf der selben Grundlage, der Verfolgung der mGDP-Fluoreszenz. Das mit N-Methylantraniloyl-Nukleotid beladene Ran-mGDP geht ein schnelles Gleichgewicht mit RCC1 ein. Durch einen hohen Überschuss an freiem GDP findet eine multi-turnover-Reaktion statt, bei der permanent Nukleotid durch RCC1 an Ran ausgetauscht wird. Durch eine vergleichbare Affinität von RCC1 zu Ran-mGDP und Ran-GDP bleibt die Konzentration des ternären Komplexes aus Ran, GDP und RCC1 während des Experiments konstant. Von der Apparatur detektierbar ist aber nur die Abnahme an Ran-mGDP. So wird eine in Bezug auf die Ran-mGDP Dissoziation irreversible Reaktion erzeugt, bei der  $k_4$  geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist.



Gleichung 19

Die so ermittelten Zeitkurven konnten einfach exponentiell angepasst werden und die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  ermittelt werden.

Der Kurvenverlauf stellte sich mit einer leichten, kurzzeitigen Zunahme des Fluoreszenzsignals und einer anschließenden stärkeren Fluoreszenzabnahme dar. Die anfängliche Erhöhung des Fluoreszenzsignals kann als Erhöhung der Fluoreszenzausbeute des mGDP bei Ausbildung des ternären Komplexes Ran-mGDP RCC1 interpretiert werden (Christian Klebe Dissertation). Aufgrund der Assoziation von RCC1 an das Ran gebundene Nukleotid wird die Umgebung der mant-Gruppe hydrophober und erhöht deren Fluoreszenzausbeute (Rensland et al., 1991). Die Abnahme des Fluoreszenzsignals zeigt die Freisetzung des Nukleotids aus dem ternären Komplex bis zum vollständigen Austausch mit nicht fluoreszierendem GDP. Unter der Annahme, daß es sich bei der Assoziation um ein schnelles, vorgelagertes Gleichgewicht ( $k_3 > k_4$ ) handelt, sollten die experimentellen Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{obs}}$ , Dimension  $[\text{s}^{-1}]$ ) gegen die RCC1-Konzentration aufgetragen einen hyperbolischen Verlauf zeigen (Abbildung 28). Durch Anpassung an Gleichung 42 kann die maximal erreichte katalytische Geschwindigkeit  $k_{\text{cat}}$  und die Konzentration der halbmaximalen Geschwindigkeit  $K_M$  entnommen werden.



**Abbildung 28: RCC1-katalysierter Nukleotidaustausch an Ran-GDP. links)** Dissoziation von Ran-GDP. 0,2  $\mu\text{M}$  Ran-mGDP<sub>[End]</sub> wurden mit 10  $\mu\text{M}$  RCC1<sub>[End]</sub> und einem 100fachen Überschuß an GDP in der Stopped-Flow-Apparatur in einem 1:1-Verhältnis gemischt und die Dissoziation durch die Abnahme der Fluoreszenz verfolgt. Die einfach-exponentielle Angleichung ergibt eine Ratenkonstante von  $k_{\text{obs}} = 22,4 \text{ s}^{-1}$ . **rechts)** Sekundärauftragung unterschiedlicher Ratenkonstanten gegen die Konzentrationen von RCC1. Die erhaltenen Ratenkonstanten wurden anschließend an eine hyperbolische Funktion angeglichen ( $K_M = 6,4 \mu\text{M}$ ;  $k_{\text{cat}} = 37 \text{ s}^{-1}$ ). Die Messung wurde bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.5 durchgeführt. Anregung: 350 nm, Emission: KV 408.

Auf diese Art wurden alle beschriebenen Mutanten in den Messungen eingesetzt und ausgewertet. Hierbei wurden die Ran-mGDP beladenen Mutanten jeweils mit steigender RCC1-Wildtyp-Konzentration vermessen, während die RCC1-Mutanten in steigender Konzentration mit Ran-Wildtyp mGDP eingesetzt wurden.  $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$  sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Kinetische Daten zum RCC1-katalysierten Nukleotidaustausch an Ran·mGDP der verschiedenen Ran- und RCC1-Mutanten.**

	$K_M$ [ $10^{-6}$ M]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ ]
Wildtyp-Proteine	6,4	37	5,78
RanV45I	1,4	28	20,00
RanE70A	2,8	1,2	0,43
RanF72A	12	1,2	0,10
RanK99A	7,4	3,7	0,50
RanW104A	n.b.	n.b.	n.b.
RanK130A	3,5	21	6,00
RCC1D95A	17	$9 \times 10^{-3}$	0,00
RCC1N149A	5,2	19	3,65
RCC1d148d151	33	1,8	0,05
RCC1Q201A	2,4	4,7	1,96
RCC1E200A	8	37	4,63
RCC1R217A	6,9	35	5,07

Die in Abbildung 28 B exemplarisch für die Wildtyp-Proteine dargestellte Messung beschreibt die ebenfalls für die Mutanten durchgeführte Messungen.

Durch Anpassung der Sekundärauftragung (s. Abbildung 28 rechts) an Gleichung 20 kann die Gleichgewichtskonstante  $K_3$  für Ran- und RCC1-Wildtyp ermittelt werden.

$$k_{obs} = \frac{k_{-4}}{1 + \frac{1/K_3}{[RCC1]}}$$

$$K_3 = \frac{k_{obs}}{(k_{-4} - k_{obs}) \times [RCC1]}$$

Gleichung 20

Die Gleichgewichtskonstante  $K_3 = 2,13 \times 10^5 M^{-1}$  ( $\approx 1/K_M$ ; s. Tabelle 5) charakterisiert die Affinität von RCC1 zu Ran·GDP und kann für das Minimalmodell zur Beschreibung der Interaktion zwischen Ran, RCC1 und GXP (s. Abbildung 26) herangezogen werden.

#### Kinetischer-, struktureller-Vergleich

Die Experimente zeigen, daß die eingeführten Mutationen zum Teil drastische Effekte auf die Ran·RCC1-Interaktion haben. Sowohl die Affinität als auch die maximal beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit sind hiervon betroffen.

Die Deletion im Bereich des extra-beta-Faltblatts zeigte einen Effekt der auf der Grundlage der strukturellen Analyse vermutet wurde. Dieser Bereich ragt eine große Fläche in Ran hinein und ist sowohl bei der Bindung an Ran als auch bei der Katalyse in

Form der Nukleotidfreisetzung beteiligt. Die Interaktionen zwischen Ran und RCC1d148d151 sind sehr stark beeinträchtigt. Hier sind sowohl  $K_M$  als auch  $k_{cat}$  stark abweichend von den gemessenen Wildtyp-Daten.  $K_M$  ist um den Faktor 5 erhöht. Durch die Verkürzung des Faltblattbereichs können wichtige Aminosäuren (147-150) nicht die für die Bindung notwendige Position einnehmen. Das führt dazu, daß der P-Loop Bereich von Ran schlechter gebunden werden kann. Als Folge verringert sich die Affinität beider Proteine zueinander.

Durch die Verkürzung des extra-beta-Faltblatts kann dieser Bereich seiner Funktion als keil- oder rammenähnliches Element ebenfalls nur schlecht nachkommen. Die Reichweite des Faltblatts in Ran hinein ist für die Interaktion mit RanK71 und somit für die Verdrängung von Switch-II wichtig. Die Verkürzung reduziert die für die Austauschreaktion notwendige sterische Interaktion. Dies Äußert sich in der Reduzierung von  $k_{cat}$

Vergleichsweise hierzu zeigt die Alanin Mutation in RCC1N149 keinen  $K_M$ -Effekt. Die notwendigen Bindungen mit dem P-Loop können stattfinden. Auch die RCC1-149-Ran-19-Bindung kann bei der Alanin-Mutante ausgebildet werden, da sie über das Rückgratsauerstoff der Aminosäure 149 erreicht wird. Die Mutation hat einen Einfluss auf die Nukleotidfreisetzung, sie bewirkt eine Halbierung der Katalysegeschwindigkeit. Die Reduzierung ist jedoch geringer als erwartet. Möglicherweise ist der Einfluss von RCC1N149 nicht so groß wie angenommen. Da das RCC1N149 jedoch sehr weit in den RanK71-Bereich hineinragt, kann davon ausgegangen werden, daß der Einfluss des Alanins ausreicht, um das Lysin zu verdrängen. Diese Vermutung wird durch den Einfluss der verkürzten Version des extra-beta-Faltblatts (RCC1d148d151) auf die katalytische Geschwindigkeit (21fache Reduzierung) bekämpft. Hier reicht N149 nicht weit genug zwischen Switch-II und den P-Loop um RanK71 zu verdrängen.

#### $G_{EQ}Q_XQLGR$ -Motiv

Die Mutationen im  $G_{EQ}Q_XQLGR$ -Motiv von RCC1 legen zum einen die katalytische Bedeutung des Glutamins 201 durch einen 8fach reduzierten  $k_{cat}$  dar, zum anderen zeigen sie, daß die Mutation in unmittelbarer Nähe zu dieser Aminosäure nicht zwangsläufig die gleiche Auswirkung hat. Die RCC1E200A-Mutante zeigte keine Veränderung der kinetischen Parameter vergleichsweise zu RCC1-Wildtyp. Dies unterstreicht eine spezifische Interaktion zwischen RCC1Q201 und RanF72. Eine Alanin-Transition in RanF72 verhält sich in ähnlicher Weise, der Effekt ist hier jedoch noch ausgeprägter. Der entsprechende Gegenrest von RCC1Q201 zeigt in der kinetischen Analyse eine 31fach reduzierte katalytische Aktivität. Es wurde die Auswirkung der Umlagerung von RanF72 und der Rückgradverlagerung von Switch-II auf den RanE70-Rest und deren Einfluss in der Nukleotidfreisetzungskaskade beschrieben (s. Strukturelle Veränderungen). Die RanE70A-Mutation zeigt wie RanF72A eine Reduzierung der katalytischen Aktivität um einen Faktor 31. Die Messung von RanW104A konnte, aufgrund der mangelnden

Fähigkeit Nukleotid binden zu können, leider nicht durchgeführt werden, so daß hier keine Stopped-Flow Daten erhalten werden konnten.

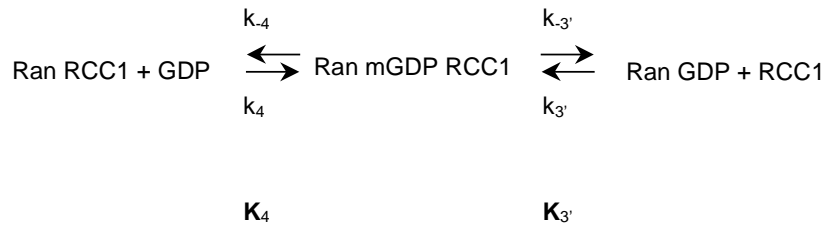
Die Auswirkung der RanK99A Mutation auf die Ran·RCC1-Interaktion mit einer 10fach reduzierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeit und einem nahezu unveränderten  $K_M$ -Wert macht deutlich, daß diese Aminosäure nicht als bindendes Element zu sehen ist, sondern vielmehr eine Funktion in der Freisetzung des Nukleotids übernimmt. Es bewirkt die Anhebung von alpha-Helix-3 und hat somit einen Einfluss auf RanW104, der sich sowohl auf den P-Loop als auch auf Switch-II auswirkt. Weiterhin wurde vermutet, daß die Verankerung in RCC1 genutzt werden kann, um den Bereich zwischen beta-Faltblatt-5 und alpha-Helix-4 aus seiner Position über RCC1D95 zu verdrängen.

Die Verdrängung des Bereiches über die beta-Faltblatt-5 und die alpha-Helix-4 geht über RanK130. Als Folge werden basenbindende Aminosäuren des  $N_XKD_{122-125}$ -Motives aus ihrer Position gebracht, was zur Freisetzung des Nukleotids beiträgt. Der Effekt der RanK130A war jedoch deutlich geringer als erwartet. Die maximal erreichbare Geschwindigkeit ist nur um einen Faktor von 1,8 zum Wildtyp reduziert. In dieser Interaktion zeigt sich jedoch ein ähnliches Problem wie bei der RCC1N149A-RanK71-Interaktion. RCC1D95 ragt in den rückgratnahen Bereich des Lysinrestes, so daß die Größe eines Alaninrestes in Ran möglicherweise noch ausreichend für einen sterischen Einfluss ist. Aufschluß über diese Fragestellung gibt die RCC1D95A Mutante. Sie zeigt eine ca. 410fache Reduzierung von  $k_{cat}$ . Die Austauschrate liegt hier aber immer noch um einen Faktor 9000 höher als die intrinsische Austauschrate von Ran ( $9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  RCC1D95A-katalysierte Austauschrate.  $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  intrinsische Austauschrate). Hierdurch wird die Bedeutung dieser Interaktion für die RCC1-katalysierte Nukleotidfreisetzung deutlich und zeigt, daß es ein wichtiges Element innerhalb einer Reaktionskaskade darstellt.

Die Mutation R217A zeigte keine Effekte.  $K_M$  und  $k_{cat}$  waren unverändert im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinen. RanV45I zeigte eine leicht erhöhte Affinität. Die katalytische Geschwindigkeit ist um einen Faktor von 0,25 reduziert. Das Verhältnis von  $k_{cat}$  zu  $K_M$  wird hierdurch von 5,78 bei Ran-Wildtyp auf 20 verschoben. Ob der durch Fleig beschriebene Phänotyp jedoch durch die veränderte Ran·RCC1-Interaktion hervorgerufen wird kann jedoch nicht gesagt werden (Fleig et al., 2000). (siehe hierzu auch 3.1.5.1).

#### **Assoziation von mGDP an den Ran·RCC1**

Der RCC1-katalysiert Nukleotidaustausch wird als reversibler Reaktionsablauf beschrieben. In dieser Reaktion wird weder die Affinität von Ran und RCC1 durch die Art des Nukleotids beeinflusst, noch zeigt Ran hier eine deutlich höhere Affinität zu einem der beiden Nukleotide (Klebe Dissertation 1995), so daß dadurch kein nukleotidgerichteter Austausch stattfindet.



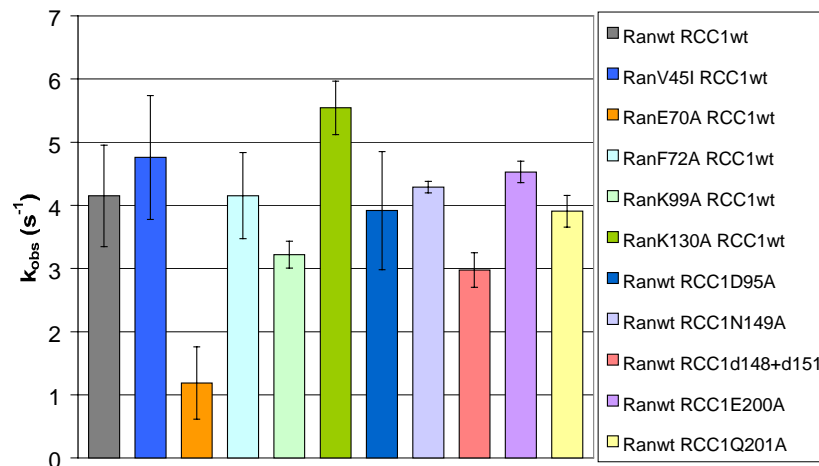
Gleichung 21

Durch den nachfolgend beschriebenen Versuchsaufbau wurde der Einfluss der in Ran und RCC1 eingeführten Mutationen auf die Assoziation des Nukleotids an den Ran·RCC1-Komplex untersucht.

Bei der Assoziation von mGDP an Ran·RCC1 wurden vorgebildete Komplexe aus Ran und RCC1 eingesetzt. Ran·GDP und RCC1 wurden für diese Komplexbildung im Verhältniss 1:1 vorinkubiert. Das Reaktionsgleichgewicht wurde durch den Zusatz von EDTA in Richtung des nukleotidfreien Komplexes verschoben (Klebe et al., 1995a). Die Abtrennung des Nukleotids wurde durch das Auftragen auf eine Gelfiltrationssäule (HiTrap®) erreicht. Diese Komplexbildung wurde für alle Ran und RCC1 Mutanten durchgeführt, wobei die Mutanten immer mit dem jeweiligen Wildtyp-Reaktionspartner komplexiert wurden.

Die Assoziation des mant-Nukleotids an den binären Komplex aus Ran und RCC1 wurde im Stopped-Flow durchgeführt. Anhand der Zunahmen der mant-Fluoreszenz, die sich durch die Bindung des Nukleotids an den Komplex ergibt, wurde die Reaktion verfolgt. Die Reaktanten wurden in gleicher Endkonzentration eingesetzt (Komplex [800nM], mGDP [800nM]). So war es noch möglich, die Fluoreszenzzunahme durch die Assoziation des mGDP an den Komplex zu detektieren. Für höhere Nukleotidkonzentrationen wurde das Hintergrundsignal zu groß, um ein ausreichendes Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen. Die assoziationsbedingte Fluoreszenzzunahme wurde hier durch die Fluoreszenz des freien Nukleotids überlagert.

Der Kurvenverlauf wurde an eine einfach exponentielle Funktion angepasst und aus jeweils zehn Einzelexperimenten gemittelt. Aus der Abbildung 29 kann entnommen werden, daß die Assoziationsgeschwindigkeiten nur geringe Unterschiede zeigen. Die beobachteten Geschwindigkeiten liegen im Bereich von 3 bis 5,5 s<sup>-1</sup>. Der stärkste Effekt ist bei RanE70A/RCC1 zu erkennen, hier ist die  $k_{\text{obs}}$  um einen Faktor von 2,9 verringert.



**Abbildung 29: Assoziation von mGDP an den Komplex aus Ran und RCC1.** 0,8  $\mu$ M Ran-RCC1-Komplex  $_{[End]}$  wurden mit 0,8  $\mu$ M mGDP  $_{[End]}$  in der Stopped-Flow-Apparatur in einem 1:1-Verhältnis gemischt und die Assoziation durch die Zunahme der Fluoreszenz verfolgt. Aufgetragen sind die aus dem einfach-exponentiellen Angleich erhaltenen Ratenkonstanten der verschiedenen Mutanten. Die Messung wurde bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5 durchgeführt. Anregung: 350 nm, Emission: KV 408.

Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die Mutationen in Ran und RCC1 nicht zu einer starken Veränderung der Affinität des Nukleotids zu dem Ran-RCC1-Komplex führen. Unter der Hinzunahme der Ergebnisse aus der intrinsischen Nukleotiddissoziationsrate (s. Experimentelle Bestimmung von  $k_{-1}$  (intrinsische Nukleotiddissoziation)) kann daher geschlossen werden, daß die Ran-Nukleotid-Interaktionen durch die eingeführten Mutationen nicht oder nur gering beeinträchtigt werden und so die gemessenen Effekte bei der Ran-GDP Dissoziation durch RCC1 (s. Tabelle 5) auf die katalysierte Austauschreaktion zurückzuführen sind.

### Kompetitionseffekt I

Bei der Determination der RCC1-katalysierten Nukleotidfreisetzung wurde für die RCC1d148d151-Mutante der Sättigungsbereich nicht erreicht.  $K_M$  und  $k_{cat}$  konnten daher nur näherungsweise ermittelt werden. Um die Verringerung der Bindungseigenschaft dieser RCC1-Mutante, aber die Fähigkeit der Konkurrenz um die Ran-Bindung mit dem Wildtyp-RCC1 zu zeigen, wurde ein ergänzender Versuchsansatzes durchgeführt. Ein Konkurrenzexperiment. Hierzu wurden die kinetischen Daten der Reaktionsgeschwindigkeit so wie der Affinität zweier weiterer RCC1-Mutanten verwendet, die ebenfalls aus den Messungen der RCC1 vermittelten Dissoziation von Ran-mGDP erhalten wurden. Diese Mutanten zeigten eine maximale katalytische Geschwindigkeit die der Hälfte (RCC1N149A) der RCC1-Wildtyp-katalysierten Geschwindigkeit und 1/8 (RCC1Q201A) dieser Geschwindigkeit entsprach. Bei diesen Mutanten wurde jeweils die maximale katalytische Geschwindigkeit erreicht, wodurch eine genaue Determination von  $K_M$  und  $k_{cat}$  erfolgen konnte. Aufgrund dieser Daten sollten sich Effekte in verschiedener Weise

auch in Gegenwart von RCC1-Wildtyp zeigen. Vor dem Konkurrenzexperiment wurden die Reaktionsgeschwindigkeit  $k_{\text{obs}}$  für RCC1-Wildtyp bei 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  und 6  $\mu\text{M}$  ermittelt.

Darauf folgend wurden Ansätze durchgeführt, bei denen zu 1  $\mu\text{M}$  RCC1-Wildtyp 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  RCC1 Mutante hinzugegeben wurden, so daß eine RCC1-Gesamtkonzentration aus Wildtyp- und Mutante-RCC1 von 2  $\mu\text{M}$  bzw. 6  $\mu\text{M}$  vorherrschte. Mutanten mit gleicher Affinität und stark verringertem  $k_{\text{cat}}$  sollten erwartungsgemäß eine reduzierte beobachtete Geschwindigkeit ( $k_{\text{obs}}$ ) im Vergleich zu RCC1-Wildtyp  $k_{\text{obs}}$  bei 1  $\mu\text{M}$  zeigen. Diese Reduzierung sollte bei Erhöhung der Konzentration stärker werden. Eine Mutante mit stark verringerter Affinität und stark verringertem  $k_{\text{cat}}$  sollte im Vergleich die beobachtete Geschwindigkeit weitestgehend unbeeinflusst lassen. Mit zunehmender Konzentration wird der Einfluss einer solchen Mutante jedoch auch größer und zeichnet sich in Form einer Reduzierung von  $k_{\text{cat}}$  aus. Wiederum sollte eine Mutante mit gleicher Affinität und leicht verringertem  $k_{\text{cat}}$  die Reaktion beschleunigen. Die Beschleunigung kann jedoch nicht in gleichem Maße stattfinden wie bei Addition gleicher RCC1-Wildtyp Konzentration.

In Tabelle 6 sind beispielhaft die aus den Ran-mGDP-Dissoziationsexperimenten (s. Tabelle 5) hervorgegangenen Daten der RCC1-Mutanten N149A, d148+d151 und Q201A dargestellt. Von diesen Mutanten zeigt RCC1N149A einen „leichten“  $k_{\text{cat}}$  Effekt. Die maximal beobachtete Geschwindigkeit liegt bei 51% der RCC1-Wildtyp Aktivität. RCC1d148+d151 zeigt durch die Erhöhung von  $K_{\text{M}}$  um einen Faktor von 82 und die Reduzierung von  $k_{\text{cat}}$  auf 5% einen „starken“ Effekt in beiden Parametern. Eine Mutante mit „stark“ reduziertem  $k_{\text{cat}}$  und leicht erhöhter Affinität stellt RCC1Q201A dar.

**Tabelle 6: Kinetische Daten zum RCC1-katalysierten Nukleotidaustausch an Ran-mGDP der verschiedenen Ran- und RCC1-Mutanten.**

	$K_{\text{M}}$ [ $10^{-6}$ M]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [ $10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]
Wildtyp-Protein	6,4	37	5,78
RCC1N149A	5,2	19	3,65
RCC1d148d151	33	1,8	0,05
RCC1Q201A	2,4	4,7	1,96

Auszug aus Tabelle 5

Das Resultat des Konkurrenzexperiments zeigt entsprechend der in (Tabelle 5) erhaltenen Daten eine verhältnismäßig geringere Erhöhung der beobachteten Geschwindigkeit der mGDP-Dissoziation von Ran durch die Zugabe von RCC1N149A. Beide in der Reaktion vorliegenden RCC1-Formen kompetieren um die Bindung an Ran. Im Fall des 1:1 Verhältnis liegen beide zu gleichen Konzentrationen in freier Form, im binären und im ternären Komplex vor.



$$[\text{RCC1} \cdot \text{Wildtyp}] = [\text{RCC1N149A}]$$

$$[\text{RCC1} \cdot \text{Wildtyp} \cdot \text{Ran} \cdot \text{mGDP}] = [\text{RCC1N149A} \cdot \text{Ran} \cdot \text{mGDP}]$$

$$[\text{Ran} \cdot \text{RCC1} \cdot \text{Wildtyp}] = [\text{Ran} \cdot \text{RCC1N149A}]$$

Gleichung 22

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird anteilig (51%) durch RCC1N149A erhöht, so daß  $k_{\text{obs}}$  näherungsweise 75% der  $k_{\text{obs}}$  von 2  $\mu\text{M}$  RCC1·Wildtyp sein sollte. Bei der Zusammensetzung aus 1  $\mu\text{M}$  RCC1·Wildtyp und 5  $\mu\text{M}$  RCC1N149A wird das Verhältnis der einzelnen RCC1-Zustände auf die Seite der Mutante verschoben, wodurch sich die Reaktionsgeschwindigkeit entsprechend diesem Verhältnis verändert.

Der Einfluss von RCC1d148+d151 und Q201A auf  $k_{\text{obs}}$  macht den Unterschied in  $K_M$  zwischen diesen beiden deutlich. Die Konkurrenz von RCC1·Wildtyp und Q201A ist vergleichbar mit der Konkurrenz von RCC1·Wildtyp und N149A, da  $K_M$  nahezu unverändert ist.

$$[\text{RCC1} \cdot \text{Wildtyp}] = [\text{RCC1Q201A}]$$

$$[\text{RCC1} \cdot \text{Wildtyp} \cdot \text{Ran} \cdot \text{mGDP}] = [\text{RCC1Q201A} \cdot \text{Ran} \cdot \text{mGDP}]$$

$$[\text{Ran} \cdot \text{RCC1} \cdot \text{Wildtyp}] = [\text{Ran} \cdot \text{RCC1Q201A}]$$

Gleichung 23

Die maximal beobachtete Geschwindigkeit von RCC1Q201A ist jedoch deutlich niedriger und führt somit zu einer Verringerung von  $k_{\text{obs}}$ . Eine Erhöhung der RCC1Q201A Konzentration bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichtes auf die Seite der Mutante und äußert sich in einer weiteren Reduzierung von  $k_{\text{obs}}$ .

RCC1d148+d151 verschiebt aufgrund seines erhöhten  $K_M$  das Gleichgewicht nur in geringem Maße. Da die Affinität zu Ran·mGDP niedriger ist, ist der Anteil an Ran-gebundenem RCC1d148+d151 kleiner und wirkt sich so weniger auf  $k_{\text{obs}}$  aus.

$$[\text{RCC1} \cdot \text{Wildtyp}] < [\text{RCC1d148+d151}]$$

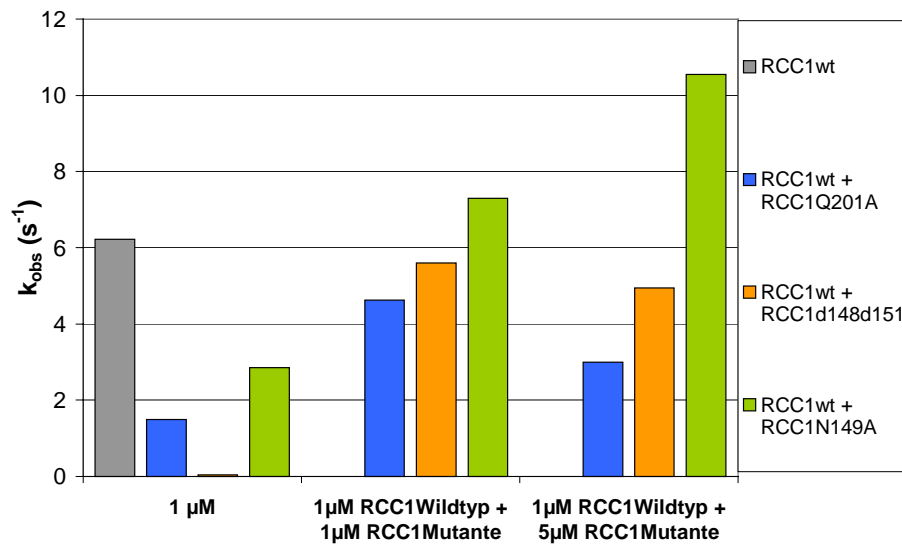
$$[\text{RCC1} \cdot \text{Wildtyp} \cdot \text{Ran} \cdot \text{mGDP}] > [\text{RCC1d148+d151} \cdot \text{Ran} \cdot \text{mGDP}]$$

$$[\text{Ran} \cdot \text{RCC1} \cdot \text{Wildtyp}] > [\text{Ran} \cdot \text{RCC1d148+d151}]$$

Gleichung 24

Der Konkurrenzeffekt ist hier deutlich geringer. Durch die Erhöhung der Konzentration kann das Gleichgewicht weiter verschoben und der Konkurrenzeffekt verstärkt werden. Eine Reduzierung von  $k_{\text{obs}}$  ist die Folge. Das Ergebnis dieses Experiments ermöglicht eine qualitative Aussage über den Einfluss der RCC1-Mutationen und den Effekt auf die Inter-

aktion mit Ran. Es kann daher als Bestätigung der Ergebnisse aus den Dissoziationsexperimenten von Ran-mGDP betrachtet werden.



**Abbildung 30: Wettbewerbseffekt verschiedener RCC1-Mutanten.** Bestimmt wurde  $k_{\text{obs}}$  der RCC1-katalysierten Ran-mGDP [0,2  $\mu\text{M}$ ] Dissoziation, unter der Anwesenheit eines 100fachen Überschusses an GDP, für RCC1-Wildtyp bei 1  $\mu\text{M}_{[\text{End}]}$  ( $k_{\text{obs}} = 6,2 \text{ s}^{-1}$ ; grau), 2  $\mu\text{M}_{[\text{End}]}$  ( $k_{\text{obs}} = 10 \text{ s}^{-1}$ ) und 6  $\mu\text{M}_{[\text{End}]}$  ( $k_{\text{obs}} = 18,9 \text{ s}^{-1}$ ).  $k_{\text{obs}}$  wurde ebenfalls für 1  $\mu\text{M}$  RCC1-Wildtyp in Kombination mit je 1  $\mu\text{M}$  [End] und 5  $\mu\text{M}$  [End] RCC1 Mutante bestimmt. Es herrschte so eine RCC1-Gesamtkonzentration aus Wildtyp- und Mutante-RCC1 von 2  $\mu\text{M}$  bzw. 6  $\mu\text{M}$  vor. Auf diese Weise wurden RCC1N149 (grün), RCC1d148d151 (orange) und RCC1Q201 (blau) vermessen. Die Messung wurde in der Stopped-Flow-Apparatur durchgeführt, wo die Reaktanten in einem 1:1-Verhältnis gemischt wurden und die Dissoziation durch die Abnahme der Fluoreszenz verfolgt. Aufgetragen sind die aus dem einfach-exponentiellen Anstieg erhaltenen Ratenkonstanten der verschiedenen Mutanten und Konzentrationen. Die Messung wurde bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH7.5 durchgeführt. Anregung: 350 nm, Emission: KV 408.

### Assoziationskinetik und Dissoziationskinetik von Ran und RCC1 (SPR)

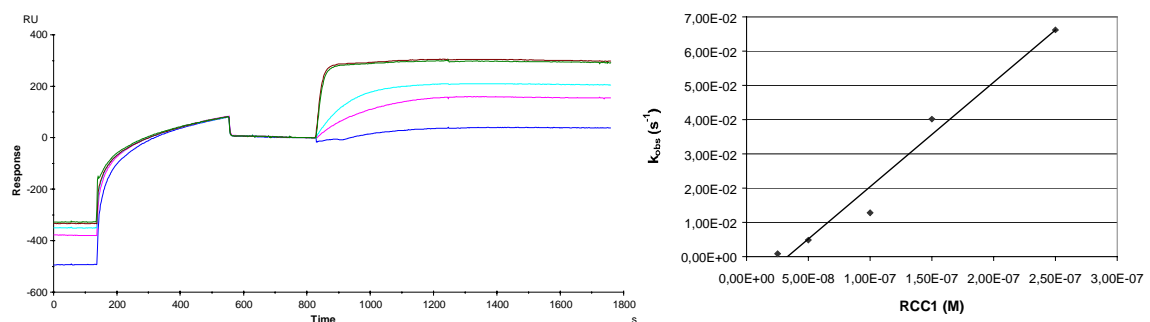
Fast alle Arbeiten zur Dynamik von kleinen GTP-bindenden Proteinen und ihren Austauschfaktoren wurden bislang mit markierten (Radioaktivität oder Fluoreszenz) Nukleotiden als Sensor durchgeführt. Aus diesem Grund konnten daher einige Geschwindigkeitskonstanten nur indirekt über die Verfolgung des vom Nukleotid ausgehenden Signals verfolgt werden. Für die Interaktion von Ran und RCC1 wurde in dieser Arbeit die Eigenschaft eines anderen System nutzbar gemacht, mit dem diese Wechselwirkungen direkt verfolgt werden konnte.

Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR, s. hierzu Material u. Methoden) ermöglicht die direkte Detektion der Bindung oder Dissoziation zweier makromolekularer Liganden über die Zu- oder Abnahme der optischen Dichte in der Sensorschicht, die sich in einer Veränderung des Brechungsindex äußert und dadurch vom Gerät registriert werden kann.

Im durchgeführten Versuchsaufbau wird ein Sensorchip verwendet, an dessen Dextranoberfläche  $\alpha$ -GST-Antikörper kovalent gebunden sind. An diese Antikörper wird der erste Ligand in Form eines GST-Fusionsproteins immobilisiert. Durch Spülen eines

Bindungspartners über den immobilisierten Liganden kommt es zur Bindung, die sich in Form einer Veränderung der optischen Dichte proportional zur Menge und Größe des gebundenen Liganden äußert. Diese zeitabhängige Veränderung wird vom System detektiert und enthält die kinetischen Informationen.

Im Vorfeld wurden experimentelle Ansätze durchgeführt, bei denen Ran durch vorherige EDTA Behandlung nukleotidfrei gemacht wurde (unveröffentlichte Daten von Dr. Jürgen Kuhlmann). Da Ran im nukleotidfreien Zustand sehr instabil ist (Klebe et al., 1995a), kann es teilweise zu Degradationen kommen die den Versuchsablauf negativ beeinflusst haben. Um dieses Problem zu umgehen und einen Vergleich der Messung mit nukleotidbeladenem Ran durchführen zu können, wurde in dieser Arbeit ein anderer Versuchsansatz gewählt. Zur Ermittlung der Assoziationsgeschwindigkeit von RCC1 an Ran-GDP wurde Ran im nukleotidbeladenen Zustand ohne vorherige EDTA-Behandlung an die GST-Antikörper immobilisiert. Über die Ran-GDP enthaltene Dextranmatrix wurde dann RCC1 gegeben, wodurch es zu einer Bindung des GEFs an Ran unter gleichzeitiger GDP-Dissoziation kommt. Durch Variieren der RCC1 Konzentration wurden verschiedene Bindungskurven erhalten, die in Abbildung 31 exemplarisch dargestellt sind. Als Negativkontrolle wurden entsprechend jeder Konzentration die unspezifische Bindung von RCC1 an GST ermittelt und diese Werte von denen mit GST-Ran subtrahiert. Hierdurch wurde der Anteil unspezifischer Assoziationen an die Matrix eliminiert. Durch Angleichen dieser „Netto“ Kurven an eine einfach exponentielle Funktion war es möglich, die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten zu ermitteln und diese gegen die Konzentration aufzutragen. Die Auftragung ergab eine Gerade, die in Form einer linearen Funktion angepasst werden konnte (s. Abbildung 31).

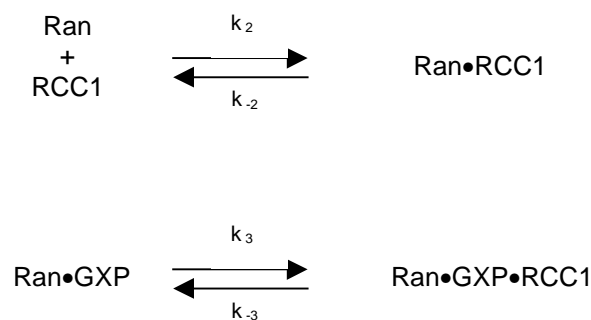


**Abbildung 31: Bindung von RCC1 an immobilisiertes GST-Ran-GDP.** links) Anti-GST Antikörper wurden kovalent an die Oberfläche eines BIAcore-Sensorchips gebunden. Diese Antikörpermatrix bindet den GST-Anteil von GST-Ran-GDP nahezu irreversibel und immobilisiert so Ran-GDP an der Sensoroberfläche (erster Anstieg). Die Zugabe verschiedener Konzentrationen RCC1 (20–200 nM,  $t > 850$  sec) konnte als konzentrationsabhängige Erhöhung des Resonanzsignals verfolgt werden (zweiter Anstieg). rechts) Sekundärauftragung unterschiedlicher Ratenkonstanten gegen die Konzentrationen von RCC1. Die erhaltenen Ratenkonstanten wurden anschließend an eine lineare Funktion angeglichen ( $k_3 = 3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Alle Experimente wurden bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5 durchgeführt ( $t = 150$  s: Auftragung von GST-Ran,  $t = 550$  s: Waschen mit Hepes Puffer,  $t = 850$  s: Auftragung RCC1). Zu Mess- und Puffer-bedingungen siehe Material und Methoden.

Aus dieser Funktion konnte die Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion von RCC1 an Ran·GDP ( $k_3 = 3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) entnommen werden. Bei der Untersuchung der Ran·GDP-RCC1-Interaktion besteht jedoch ein anderes zu berücksichtigendes Problem. Die Bindung des GEFs an den Komplex aus Ran und Nukleotid, zu Beginn der Reaktion, zeigt eine Überlagerung verschiedener Ereignisse. Zunächst kann die Bindung des GEFs an den Ran-GDP-Komplex erfolgen und die Assoziation dieser Interaktionspartner wird detektiert. Unmittelbar nachdem diese Bindung erfolgt ist, kommt es jedoch zur Dissoziation entweder des Nukleotids oder des RCC1. Die Dissoziation von RCC1 führt im Gegensatz zur Dissoziation des Nukleotids zu einer registrierbaren Abnahme der optischen Dichte. Assoziation anderer GEFs an RCC1 ungebundenes Ran·GDP und beschriebene Dissoziationen überlagern sich.

Kommt es zur Freisetzung des Nukleotids, führt dies aufgrund der vergleichsweise geringen Masse nicht zu einer detektierbaren Signaländerung. Das freie Nukleotid kann jedoch wiederum, bevor es aus der Messkammer herausgespült wird, an einen sich bereits gebildeten Komplex aus Ran und RCC1 binden und die Dissoziation des GEF induzieren. Diese Dissoziation würde wiederum vom System detektiert und überlagert ebenfalls die Assoziationskinetik.

Durch einen Vergleich der oben beschriebenen Daten aus den Messungen mit nukleotidfreiem Ran und der hier durchgeführten Arbeit mit nukleotidbeladenem Ran konnte jedoch festgestellt werden, daß die Assoziationsgeschwindigkeit von RCC1 an GST-Ran (nukleotidfrei) und GST-Ran-GDP keine signifikanten Unterschiede zeigen.



Gleichung 25

Die Erkennung von Ran durch RCC1 wird demnach durch das Vorhandensein von Nukleotid nicht wesentlich beeinflusst, woraus folgt, daß die Unterschiede der Gleichgewichtskonstanten  $K_2$  und  $K_3$  unmittelbar von den jeweiligen Dissoziationskonstanten abhängen.

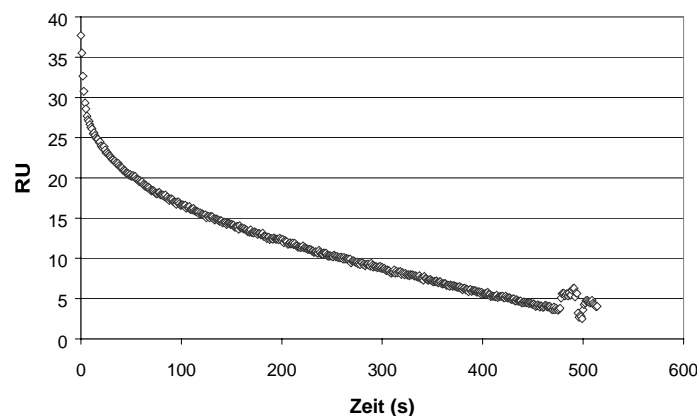
Unter Einbeziehung von  $k_3$  und der aus den Stopped-Flow Experimenten ermittelten Gleichgewichtskonstanten  $K_3$  ( $2,13 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) für die Wildtyp-Proteine konnte nun  $k_{-3}$  ( $1,4 \text{ s}^{-1}$ ) berechnet werden.

$$K_3 = \frac{k_3}{k_{-3}}$$

Gleichgewichtskonstante der Dissoziation	$K_3 =$	$2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
Geschwindigkeitskonstante der Assoziationskonstante	$k_3 =$	$3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion	$k_{-3} =$	$1,4 \text{ s}^{-1}$

Gleichung 26

Neben der beschriebenen Assoziationsreaktion kann im gleichen SPR-Aufbau auch die Dissoziationsreaktion betrachtet werden. So wurde zunächst durch Inkubation mit RCC1 ein GST Ran·RCC1-Komplex generiert und nachfolgend die Oberfläche der Dextranmatrix kontinuierlich mit Puffer gespült. Hierdurch wird gewährleistet, daß dissoziiertes RCC1 aus dem Reaktionsraum entfernt wird und somit nicht mehr für eine Bindung an Ran zur Verfügung steht. Der Kurvenverlauf zeigt dann die Dissoziationsphase des Ran·RCC1-Komplexes in Abwesenheit des Nukleotids. Die Dissoziation äußerte sich in einer einfach-exponentiell abfallenden Funktion, deren  $k_{\text{obs}}$   $k_{-2}$  entsprach. Die konzentrationsunabhängige Dissoziationskonstante  $k_{-2}$  konnte so ebenfalls ermittelt werden.



**Abbildung 32: Dissoziation des immobilisiertem GST-Ran-RCC1-Komplexes.** Anti-GST Antikörper wurden kovalent an die Oberfläche eines BIAcore-Sensorchips gebunden. Diese Antikörpermatrix bindet den GST-Anteil von GST-Ran-GDP nahezu irreversibel und immobilisiert so Ran an der Sensoroberfläche. Durch die Zugabe von RCC1 (200 nM) konnte ein Komplex aus GST-Ran und RCC1 gebildet werden. Dargestellt ist die beobachtete Dissoziationsphase von GST-Ran und RCC1 während des Spülvorgangs mit 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5 bei 20°C. Die einfach-exponentielle Angleichung ergibt eine Ratenkonstante von  $k_{\text{obs}} = 2,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Zu Mess- und Puffer-bedingungen siehe Material und Methoden.

Da die Assoziationskonstante von RCC1 durch die Anwesenheit des Nukleotids offensichtlich nicht beeinflusst wird, kann  $K_2$  berechnet werden.

$$K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion  $k_{-2} = 2,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Gleichung 27

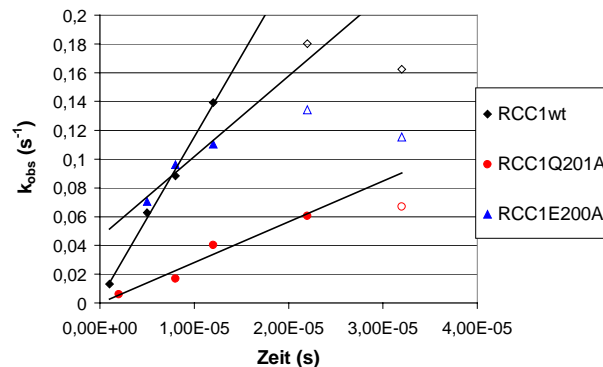
### Assoziationskinetik von 1,5-IAEDANS-RanC-Mutanten und RCC1

Neben der SPR-Methode gab es noch eine weitere Möglichkeit, direkte Informationen über die Assoziationsgeschwindigkeit zwischen Ran und RCC1 zu erhalten. Krämer entwickelte zur Messung der Ras-RasGAP-Interaktionen einen Versuchsaufbau, bei dem nicht das Nukleotid, sondern ein Cysteinrest von Ras mit einem Fluorophor markiert war (A. Krämer, 2001). Diese Methode wurde von M. Seewald auf Ran übertragen. Zur Messung der Ran-RanGAP- und Ran-RanBP1-Interaktionen klonierte er in seiner Dissertationsarbeit (2002) zwei Ran-Mutanten (RanC112S/V47C und RanC112S/S94C), die aufgrund der oberflächenexponierten Cysteine in der Ran-GDP-Form für eine Kopplung mit 1,5-IAEDANS geeignet waren und deren relative Seitenkettenzugänglichkeit sich durch die Bindung von RanGAP oder RanBP1 veränderte, so daß es bei der Bindung zu einer Erhöhung der Fluoreszenz kam.

Aufgrund des Interesses an der Assoziationsgeschwindigkeit von Ran-GDP und RCC1 wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes (NACCESS) die Lösungsmittelzugänglichkeit von RanV47 und RanS94 für RCC1-gebundenes Ran-GDP ermittelt. Demnach veränderte sich die Lösungsmittelzugänglichkeit durch die RCC1-Bindung von 13% auf 0% für RanV47 und von 42% auf 7-8% für RanS94. Das Resultat dieser Computeranalyse ließ darauf schließen, daß die Bindung von RCC1 eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals sowohl bei RanC112S/V47C als auch bei RanC112S/S94C bewirken sollte. Beide Mutanten wurden daraufhin auf ihre Interaktion mit RCC1 in der Stopped-Flow-Apparatur untersucht. RanC112S/S94C wurde hierfür ebenfalls in Betracht gezogen, obwohl aus der vorangegangenen Strukturanalyse hervorgegangen war, daß sowohl RanS94 als auch umliegende Aminosäurereste (93-103) in die Ran-RCC1-Interaktion involviert sind und so keine durch die RanC112S/S94C-Mutante unbeeinflusste Messung zu erwarten war.

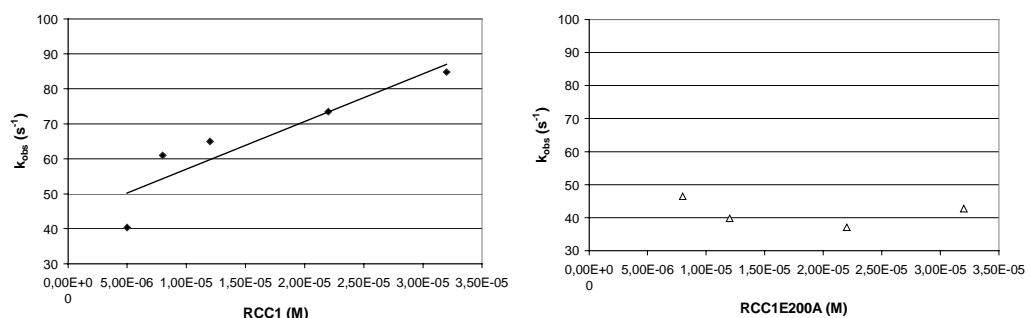
Diese Vermutung wurde durch die Resultate der Assoziationsgeschwindigkeit von RCC1 an RanC112S/-S94C-GDP bestätigt. Hier konnte für RCC1-Wildtyp eine maximal beobachtete Geschwindigkeit ( $k_{\text{obs}}$ ) von  $0,18 \text{ s}^{-1}$  detektiert werden. Vergleichsweise hierzu liegt die in Tabelle 1 gezeigte RCC1-katalysierte Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran für die Wildtyp-Proteine bei  $37 \text{ s}^{-1}$ . Ähnlich geringe Werte zeigten auch die RCC1-Mutanten E200A ( $k_{\text{obs max}} = 0,13 \text{ s}^{-1}$ ) und Q201A ( $k_{\text{obs max}} = 0,06 \text{ s}^{-1}$ ). Weiterhin zeigte die Sekundär-auftragung der beobachteten Geschwindigkeiten ( $k_{\text{obs}}$ ) gegen die jeweilig

eingesetzte RCC1-Konzentration nur anfänglich einen linearen Verlauf (Steigung: RCC1-Wildtyp =  $1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , RCC1E200A =  $5,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , RCC1Q201A  $2,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und ging bei höheren Konzentrationen in eine Sättigung bzw. viel sogar wieder ab. (s. Abbildung 33). Möglicherweise ist die Veränderung der Fluoreszenz hier nicht ein Resultat der RCC1-Bindung, sondern wird durch konformationelle Veränderungen nach der Bindungsreaktion hervorgerufen. Wird dieser Schritt ab einer gewissen RCC1-Konzentration der zeitlich limitierend, könnte hierdurch das Abflachen der Steigung erklärt werden, nicht jedoch das Abfallen.



**Abbildung 33: Assoziation von RanC112S/S94C-1,5-IAEDANS-GDP und RCC1 in Gegenwart von GDP.** Stopped-Flow-Messung.  $0,4 \mu\text{M}_{[\text{End}]}$  Ran C112S/S94C-IAEDANS-GDP wurden mit steigenden Konzentrationen (1-32  $\mu\text{M}$ ) RCC1-Wildtyp (schwarz), RCC1E200A (blau) bzw. RCC1Q201A (rot) mit einem 100fachen Überschuß an freiem GDP, in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH7.5 bei  $20^\circ\text{C}$  in der Stopped-Flow-Apparatur in einem 1:1-Verhältnis gemischt und die erhaltenen Geschwindigkeiten ( $k_{\text{obs}}$ ) gegen die jeweilige RCC1-Konzentration aufgetragen. Die schwarzen Kurven zeigen den Angleich an eine doppelt-exponentielle Funktion.

Für die Interaktion von RanC112S/V47C-1,5-IAEDANS-GDP und RCC1 in Gegenwart von GDP konnten Assoziationsgeschwindigkeiten für RCC1-Wildtyp ermittelt werden, die gegen die eingesetzte RCC1-Konzentration näherungsweise an eine lineare Funktion angeglichen werden konnten (s. Abbildung 34).

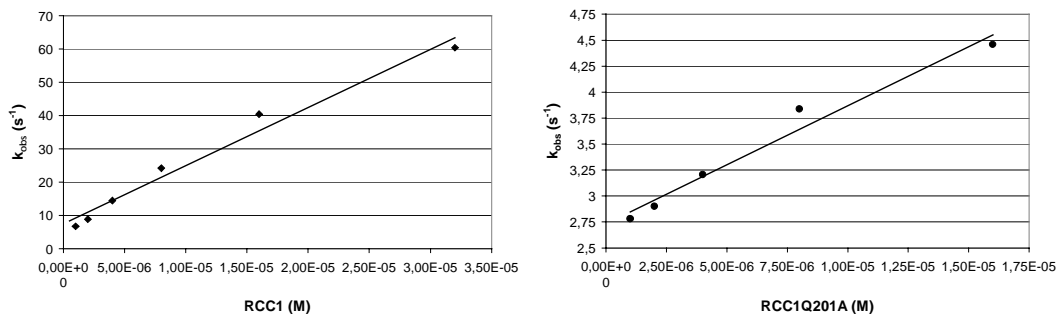


**Abbildung 34: Assoziation von RanC112S/V47C-1,5-IAEDANS-GDP und RCC1 in Gegenwart von GDP.** Stopped-Flow-Messung.  $0,4 \mu\text{M}_{[\text{End}]}$  Ran C112S/V47C-IAEDANS-GDP wurden mit steigenden Konzentrationen (5 bzw. 8-32  $\mu\text{M}$ ) RCC1-Wildtyp (links) bzw. RCC1E200A (rechts) mit einem 100fachen Überschuß an freiem GDP, in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH7.5 bei  $20^\circ\text{C}$  in der Stopped-Flow-Apparatur in einem 1:1-Verhältnis gemischt und die erhaltenen Geschwindigkeiten ( $k_{\text{obs}}$ ) gegen die jeweilige RCC1-Konzentration aufgetragen. Die schwarzen Linien zeigen den Angleich an eine lineare Funktion. Zu Mess- und Pufferbedingungen siehe Material und Methoden.

Ihr konnte eine Geschwindigkeitskonstante der Assoziation von  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  entnommen werden.

Das Ergebnis der gleichen Messung, jedoch mit RCC1E200A anstelle des Wildtyp-Proteins, zeigte beobachtete Geschwindigkeiten ( $k_{\text{obs}}$ ), die einen maximalen Wert von  $45 \text{ s}^{-1}$  nicht überschritten. Bei Wildtyp-RCC1 konnte bei  $32 \mu\text{M}$  vergleichsweise eine Geschwindigkeiten ( $k_{\text{obs}}$ ) von  $84 \text{ s}^{-1}$  ermittelt werden. Da sich bei RCC1E200A aber weder die RCC1 katalysierte Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran, noch die abgeleitete Affinität zu Ran vom Wildtyp-Protein unterscheidet (s. Tabelle 5), ist dieses Ergebnis sehr überraschend. Weiterhin scheint die Assoziationsgeschwindigkeit hier konzentrationsunabhängig zu sein (s. Abbildung 34). Dies ist möglicherweise auf den eingesetzten Konzentrationsbereich von 5 bis  $32 \mu\text{M}$  RCC1E200A zurückzuführen, in dem ggf. bereits die maximale Assoziationsgeschwindigkeit erreicht wurde. Eine solche Annahme ist jedoch aufgrund der Affinität zwischen Ran und RCC1 eher unwahrscheinlich. Für die RCC1-Mutanten D95A und Q201A konnten in Anwesenheit eines 100fachen GDP-Überschusses keine verwertbaren Daten erhalten werden.

Die Abwesenheit von freiem GDP machte es möglich, auswertbare Geschwindigkeiten für die Assoziation von RCC1Q201A und RanC112S/V47C-1,5-IAEDANS zu erhalten, wodurch die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation ( $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) ermittelt werden konnte (s. Abbildung 35).



**Abbildung 35: Assoziation von RanC112S/V47C-1,5-IAEDANS-GDP und RCC1 in Abwesenheit von freiem GDP.** Stopped-Flow-Messung.  $0,4 \mu\text{M}_{[\text{End}]}$  Ran C112S/V47C-IAEDANS-GDP wurden mit steigenden Konzentrationen ( $1\text{-}16$  bzw.  $32 \mu\text{M}$ ) RCC1-Wildtyp (links) bzw. RCC1Q201A (rechts), in  $10 \text{ mM}$  Hepes,  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{pH}7.5$  bei  $20^\circ\text{C}$  in der Stopped-Flow-Apparatur in einem 1:1-Verhältnis gemischt und die erhaltenen Geschwindigkeiten ( $k_{\text{obs}}$ ) gegen die jeweilige RCC1-Konzentration aufgetragen. Die schwarzen Linien zeigen den Angleich an eine lineare Funktion.

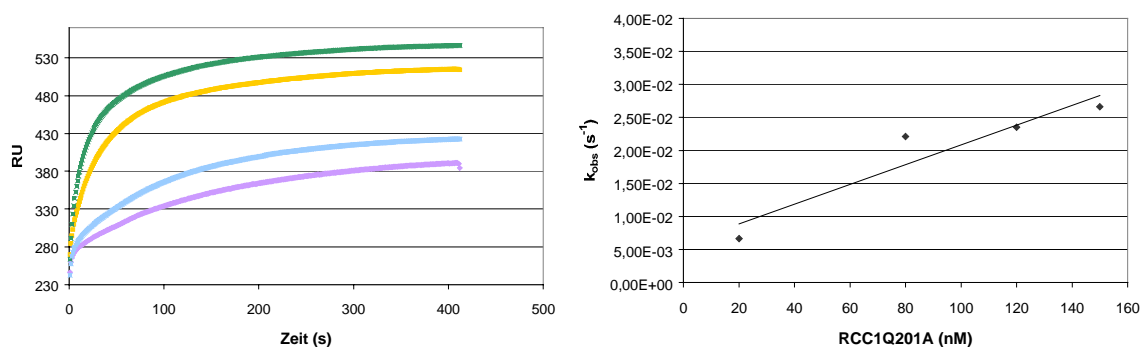
Die Abwesenheit des Nukleotids verschiebt das Reaktionsgleichgewicht, so daß letztlich mehr RCC1-gebundenes Ran vorliegt und die Fluoreszenzänderung stärker ist. Dies äußerte sich sowohl bei der Messung mit RCC1Q201A als auch bei der Messung mit Wildtyp-RCC1 in 5-7fach größeren Reaktionsamplituden. Für die RCC1-Wildtyp-RanC112S/-V47C-1,5-IAEDANS-Interaktion betrug die ermittelte Geschwindigkeitskonstante der Assoziation  $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (s. Abbildung 35), und war so um einen Faktor zwei größer als in Anwesenheit eines 100fachen Überschusses GDP und somit näherung-



sweise vergleichbar. Für RCC1D95A konnten auch in Abwesenheit von freiem GDP keine verwertbaren Daten erhalten werden. Es konnte hier auch bei hoher RCC1D95A-Konzentration und langer Inkubationszeit (10 min) keine Amplitudenveränderung registriert werden.

Insgesamt kann gesagt werden, daß sich die aus der Strukturanalyse hervorgegangenen Vermutungen in Bezug auf die RanC112S/S94C-Mutante bestätigt haben. Diese Aminosäure ist in die Ran·RCC1-Interaktion involviert und daher nicht für die Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeit von Ran und RCC1 geeignet. Ob die Ergebnisse aus den mit RanC112S/V47C-1,5-IAEDANS gemachten Untersuchungen in Bezug auf Ran- und RCC1-Wildtyp die tatsächliche Geschwindigkeitskonstante der Assoziation zeigten, ist unter Berücksichtigung der nicht eindeutigen Ergebnislage der Messung mit RCC1E200A ebenfalls fraglich. In Bezug auf die durch die SPR-Methode erhaltene Geschwindigkeitskonstante der Assoziation, besteht ein Unterschied um den Faktor 6,5. Möglicherweise ist die aus der Ran·RanGAP- und Ran·RanBP1-Interaktion hervorgegangene RanV47C-Mutation nicht ohne weiteres auf die Interaktion von Ran und RCC1 übertragbar. Strukturelle Hinweise, daß RanV47 an der Ran·RCC1-Interaktion beteiligt ist, konnten nicht erhalten werden. Der RCC1-katalysierte Nukleotidaustausch an RanV45I (s. Tabelle 5) zeigte jedoch, daß die katalytische Geschwindigkeit durch diese Mutation um den Faktor 1,3 und  $K_M$  um den Faktor 4,6 verringert wird. Die Wahrscheinlichkeit, daß die Veränderungen in Ran47 (Valin-Cystein-Wechsel und Anhängen einer fluorophoren Gruppe) einen Einfluss auf die Ran·RCC1-Interaktion haben, besteht daher.

### Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeit von RCC1Q201A an Ran·GDP.



**Abbildung 36: Assoziation von RCC1Q201A an immobilisiertes GST-Ran·GDP.** Anti-GST-Antikörper wurden kovalent an die Oberfläche eines BIAcore-Sensorchips gebunden. Diese Antikörpermatrix bindet den GST-Anteil von GST-Ran·GDP nahezu irreversibel und immobilisiert so Ran·GDP an der Sensoroberfläche. **links**) Die Zugabe verschiedener Konzentrationen RCC1Q201A (20-150 nM) konnte als konzentrationsabhängige Erhöhung des Resonanzsignals verfolgt werden. **rechts**) Sekundärauftragung unterschiedlicher Ratenkonstanten gegen die Konzentrationen von RCC1Q201A. Die erhaltenen Ratenkonstanten wurden anschließend an eine lineare Funktion angeglichen ( $k_3 = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Alle Experimente wurden bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4 durchgeführt. Zu Mess- und Pufferbedingungen siehe Material und Methoden.

Mit einem vergleichbaren Versuchsaufbau wie oben beschrieben wurden erste Messungen für die katalytisch wichtige RCC1Q201A-Mutante durchgeführt. Es wurde GST-Ran-GDP an den mit  $\alpha$ -GST Antikörper beladenen Sensorchip gekoppelt. Nachfolgend wurden verschiedene Konzentrationen RCC1Q201A über diesen Sensorchip gespült und die Assoziationsreaktion an Ran-GDP verfolgt.

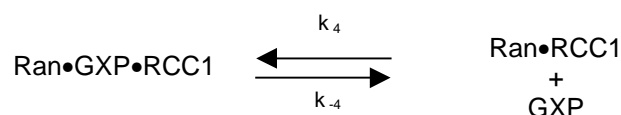
Hier konnten die Versuchsergebnisse zeigen, daß diese Mutation eine dem RCC1-Wildtyp vergleichbare Assoziationskonstante ( $1,50 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) aufweist. Dieses Resultat fügt sich in das Bild aus den Ran-mGDP Dissoziationsexperimenten und zeigt, daß die Alanin Mutation in der Aminosäure 201 keinen Einfluss auf die Bindung von Ran hat.

Nicht nur die Assoziationskonstante, sondern auch die Dissoziationskonstante des Ran-RCC1-Komplexes ist in Bezug auf RCC1-Wildtyp kaum verändert. Das kann aus den nachfolgenden Experimenten entnommen werden (s. Abbildung 38). Die Reduzierung der maximal beobachteten Geschwindigkeit, die den Ran-mGDP-Dissoziationsexperimenten zu entnehmen ist (s. Tabelle 5), muß offensichtlich aus einer Veränderung in  $K_4$ , dem Dissoziationsgleichgewicht des ternären Komplexes aus Ran, GDP und RCC1 hervorgehen.

$$K_4 = \frac{k_4}{k_{-4}}$$

Gleichung 28

Das aus dem Assoziationsexperiment von mGDP an den Ran-RCC1-Komplex erlangte Ergebnis (s. Abbildung 29) weist allerdings darauf hin, daß die Assoziation des Nukleotids an den Komplex ebenfalls nur geringfügig verändert ist.

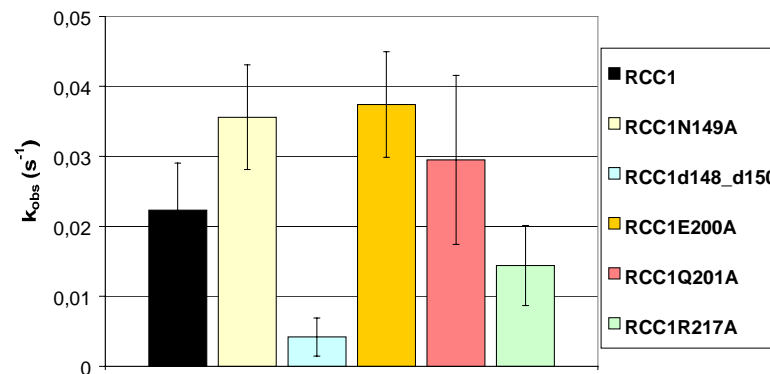


Gleichung 29

Zusammenfassend kann demnach davon ausgegangen werden, daß die verlangsamte katalytische Geschwindigkeit auf eine verringerte Dissoziationskonstante des Nukleotids aus dem Ran-GDP-RCC1-Komplex ( $k_{-4}$ ) zurückzuführen ist. RCC1Q201A kann durch die Bindung an Ran-GDP die Affinität des Nukleotids nicht in gleicher Weise heruntersetzen wie RCC1-Wildtyp. Eine hierfür notwendige Konformationsänderung findet nicht statt. Die aus der strukturellen Analyse erhaltenen Daten zeigen, daß es sich hierbei um die Verschiebung (Kettenreaktion) von RanF72, RanE70 und RanW104 handelt. Das verdeutlicht die katalytische Bedeutung dieser Aminosäure für die Nukleotidaustauschreaktion.

### Assoziation von RCC1-Wildtyp und -Mutanten an GST-Ran

Das SPR-System von Biacore® wurde weiter genutzt, um auch die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten der anderen RCC1-Mutanten an GST-Ran-GDP zu erhalten. In diesem experimentellen Ansatz wurde die Dextranmatrix wie zuvor beschrieben mit GST-Ran-GDP beladen. Die Assoziation wurde für Ansätze mit jeweils 100 nM RCC1-Mutante ermittelt.



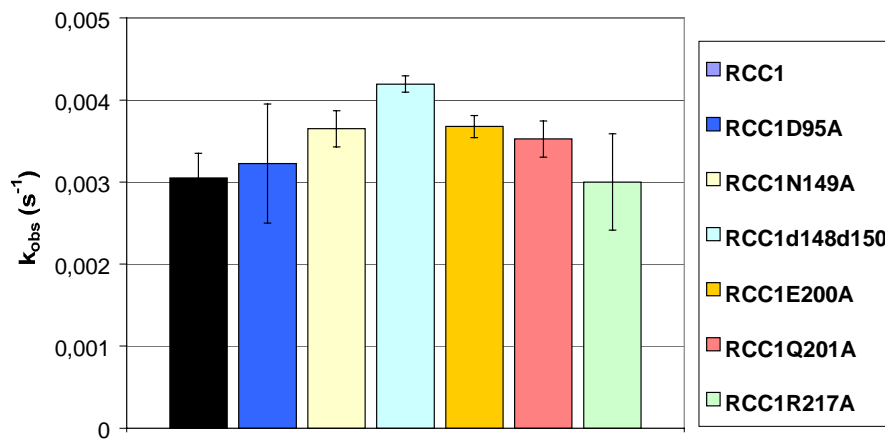
**Abbildung 37: Assoziation von RCC1-Mutanten an immobilisiertes GST-Ran-GDP.** Anti-GST-Antikörper wurden kovalent an die Oberfläche eines BIAcore-Sensorchips gebunden. Diese Antikörpermatrix bindet den GST-Anteil von GST-Ran-GDP nahezu irreversibel und immobilisiert so Ran-GDP an der Sensoroberfläche. Die Zugabe von RCC1 (-Mutanten) (100 nM) konnte als Erhöhung des Resonanzsignals verfolgt werden. Durch einen einfach-exponentiellen Angleich konnte die Ratenkonstante ( $k_{obs}$ ) der verschiedenen RCC1-Mutanten ermittelt werden, die hier vergleichend gegeneinander aufgetragen sind. Alle Experimente wurden bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4 durchgeführt.

Die beobachteten Geschwindigkeiten zeigten bei RCC1d148d151 eine signifikante Reduzierung der Assoziationsgeschwindigkeit ( $4 \times 10^{-3} s^{-1}$ ). Dies ist auf die Deletion im extra-beta-Faltblatt zurückzuführen. Durch diese Deletion wurde ein Teil eines wichtigen Erkennungselements verändert, was, wie die Fluoreszenzmessung des RCC1-katalysierten Nukleotidaustausch zeigten, auch die Affinität von RCC1 und Ran herabsetzt. Obwohl RCC1D95A eine Assoziationsgeschwindigkeit ( $1,8 \times 10^{-3} s^{-1}$ ) zeigte die mit der des RCC1-Wildtyps vergleichbar ist muß erwähnt werden, daß innerhalb der unterschiedlichen experimentellen Ansätze starke Schwankungen detektiert wurden, die dazu führten, daß keine eindeutige Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeit möglich war.

Die anderen Mutationen zeigen keine signifikante Veränderung der beobachteten Geschwindigkeit, die sich im Bereich von  $1,5 \times 10^{-2}$  bis  $3,7 \times 10^{-2} s^{-1}$  bewegt (s. Abbildung 37).

Nach Abschluss der Assoziationsphase konnte durch das Spülen mit proteinfreiem Puffer die Dissoziationsphase betrachtet werden und  $k_{-2}$  für die jeweilige RCC1-Mutante bestimmt werden. Die Resultate der Dissoziation lassen darauf schließen, daß sich durch die Mutationen keine deutlichen Veränderungen für  $k_{-2}$  ergeben. Sie liegen im Bereich von

$3,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bis  $3,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . RCC1d148d151 zeigt auch hier eine leichte Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeit ( $4,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), so daß für diese Mutante das Bild eines RCC1 mit verringerter Affinität zu Ran, wie es aus der komplexen Reaktion der Ran-mGDP-Dissoziationsexperimente hervorgegangen ist, bestätigt wird.



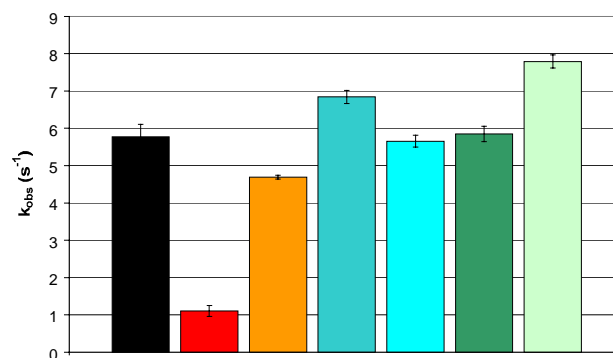
**Abbildung 38: Dissoziation von GST-Ran und RCC1-Mutanten.** Anti-GST-Antikörper wurden kovalent an die Oberfläche eines BIAcore-Sensorchips gebunden. Diese Antikörpermatrix bindet den GST-Anteil von GST-Ran-GDP nahezu irreversibel und immobilisiert so Ran-GDP an der Sensoroberfläche. Nach der Bindung der jeweiligen RCC1-Mutante (100 nM) konnte die Dissoziation während der Pufferspülphase verfolgt werden. Durch einen einfach-exponentiellen Angleich konnten die Ratenkonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) der verschiedenen RCC1-Mutanten ermittelt werden, die hier vergleichend gegeneinander aufgetragen sind. Alle Experimente wurden bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4 durchgeführt.

### RCC1-katalysierter Nukleotidaustausch an Ran-mGDP unter dem Einfluss verschiedener Polyanione

Der nukleotidfreie Ran-RCC1-Komplex enthält ein Polyanion, das von der zirkulären Struktur des P-Loops gebunden wird, die normalerweise das Phosphat des Nukleotids umschließt. Die Bindung dieses Anions wird auf die gleiche Weise vermittelt, wie für das beta-Phosphat des GDP, nämlich über RanK23 und RanT24. Das Anion ist wahrscheinlich ein  $\text{SO}_4^{2-}$  was aufgrund der Kristallisierungsbedingungen in den Komplex eingebettet wurde (s. Bedeutung des Anions). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß das Fehlen des Nukleotids ein Kollabieren des P-Loop bewirkt und so die Bindungsstelle für das Nukleotid nicht mehr zugänglich ist. Hiermit kann möglicherweise auch die Instabilität von nukleotidfreiem Ran begründet werden. Die Vermutung liegt nahe, daß der P-Loop Bereich durch das Polyanion stabilisiert wird und so auch der Ran-RCC1-Komplex. Da es sich bei der vollständig RCC1-katalysierten Reaktion um einen Austausch des Nukleotids handelt, muß der Nukleotidbindungsbereich nach der Freisetzung zugänglich für das neue Nukleotid sein. Ob die Stabilisierung dieser Bindungsstelle durch das Sulfat eine Bedeutung innerhalb der Zelle hat und ob ggf. sogar der Nukleotidaustausch innerhalb der

Zelle ebenfalls über ein vergleichbares Intermediat reguliert wird, kann hier nur vermutet werden. Sehr wahrscheinlich ist aber, daß die gelöste Struktur des Ran·RCC1-Komplexes nicht das Resultat einer abgeschlossenen Reaktion zeigt, sondern ein Zwischenprodukt wiedergibt, welches durch die Sulfatbindung stabilisiert wird.

Um die Rolle des Anions im Komplex besser zuordnen zu können, wurde der Einfluss verschiedener Polyanione auf die katalytische Reaktion untersucht. Mit Hilfe der Stopped-Flow-Apparatur wurde zunächst die experimentelle Bestimmung apperenter Geschwindigkeitskonstanten für die Nukleotidaustauschreaktion unter dem Einfluss verschiedener Polyanione durchgeführt. Innerhalb des ersten experimentellen Ansatzes wurden zu dem jeweils eingesetzten Puffer  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , KPi, PPi und PPPi zugefügt. Die Zeitkurven der RCC1-katalysierten Nukleotiddissoziation wurden bei jeweils konstanter Konzentration an Ran·mGDP- und freiem (überschüssigem) GDP ermittelt. Sie wurden einfach-exponentiell angepasst und jeweils 10 Einzelexperimente gemittelt. Die so erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  wurden vergleichend gegeneinander aufgetragen.

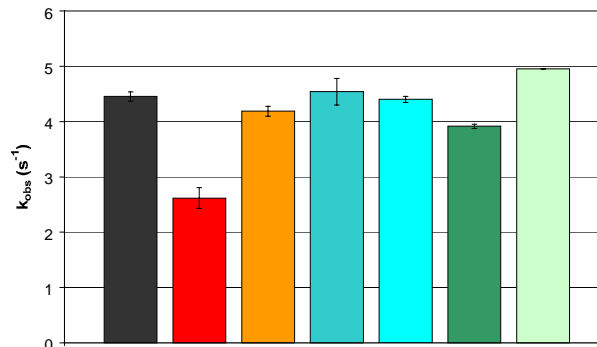


**Abbildung 39: RCC1-katalysierter Nukleotidaustausch an Ran·GDP unter dem Einfluss verschiedener Polyanione.** Dissoziation von Ran·GDP.  $0,2 \mu\text{M}$  Ran·mGDP<sub>[End]</sub> wurden mit  $1 \mu\text{M}$  RCC1<sub>[End]</sub> und einem 100fachen Überschuß an GDP in der Stopped-Flow-Apparatur in einem 1:1-Verhältnis gemischt und die Dissoziation durch die Abnahme der Fluoreszenz verfolgt. Durch einen einfach-exponentiellen Angleich konnte die Ratenkonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) unter dem Einfluss der verschiedenen Polyanione ermittelt werden, die hier vergleichend gegeneinander Aufgetragen sind (v. l. n. r.: ohne, 10 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10 mM KPi, 1 mM KPi, 1 mM PPPi, 1 mM PPi). Die Messung wurde bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH7.5 durchgeführt. Anregung: 350 nm, Emission: KV 408.

Der Abbildung 39 ist zu entnehmen, daß der Zusatz von mono-, die- oder tri-Phosphat keinen geschwindigkeitsreduzierenden Einfluss auf die RCC1-katalysierte Nukleotidfreisetzung hat. Der Zusatz von 1 mM Sulfat zeigt nur eine geringe allerdings signifikante Reduzierung. Deutlich wird der Einfluss von Sulfat jedoch bei einer Konzentration von 10 mM. Hier ist die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 5,5 reduziert.

Innerhalb des zweiten experimentellen Ansatzes wurde  $k_{\text{obs}}$  der Assoziation und folgende Dissoziation von freiem mGDP an einen vorgebildeten Komplex aus Ran und RCC1 (wie für Abbildung 29 beschrieben) ermittelt. Der Puffer wurde entsprechend des ersten experimentellen Ansatzes mit den verschiedenen Zusätzen versehen.

Die Resultate zeigen einen zum vorherigen Experiment vergleichbaren Trend unter dem Einfluss von Sulfat. Die Assoziation des Nukleotids beim Zusatz von 10 mM Sulfat wird signifikant, jedoch nur um das 2,2fache, reduziert.



**Abbildung 40: Assoziation von mGDP an den Komplex aus Ran und RCC1 unter dem Einfluss verschiedener Polyanione.** 0,8  $\mu\text{M}$  Ran-RCC1-Komplex<sub>[End]</sub> wurden mit 0,8  $\mu\text{M}$  mGDP<sub>[End]</sub> in der Stopped-Flow-Apparatur in einem 1:1-Verhältnis gemischt und die Assoziation durch die Zunahme der Fluoreszenz verfolgt. Durch einen einfach-exponentiellen Angleich konnte die Ratenkonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) unter dem Einfluss der verschiedenen Polyanione ermittelt werden, die hier vergleichend gegeneinander aufgetragen sind (v. l. n.r.: ohne, 10 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KPi, 1 mM KPi, 1 mM PPPi, 1 mM PPI). Die Messung wurde bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5 durchgeführt. Anregung: 350 nm, Emission: KV 408.

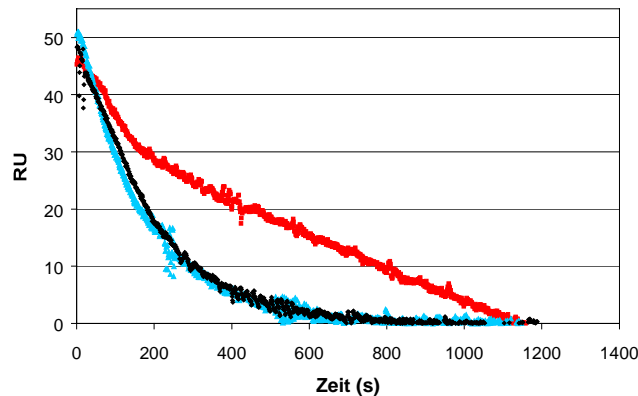
#### Stabilisierung von Ran-RCC1 unter Abwesenheit von GDP

Aus den Stopped-Flow-Untersuchungen geht hervor, daß die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit durch den Einfluss von Sulfat reduziert wird. Die Stabilität des Komplexes kann hieraus nur indirekt entnommen werden, da die Veränderung der Mantnukleotidfluoreszenz und somit die Freisetzung des Nukleotids betrachtet wurde. Um eine Stabilisierung des Komplexes aus Ran und RCC1 detektieren zu können, wurde eine weitere Methode verwendet. Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ermöglicht es, wie im Vorfeld beschrieben mit Hilfe eines GST-Ran-Fusionsproteins, die Dissoziation des Komplexes aus Ran und RCC1 unter der Abwesenheit von freiem Nukleotid zu ermitteln.

Im folgenden Experiment wurde ein vergleichbarer Versuchsaufbau verwendet, wie er in der Assoziationskinetik von GST-Ran-GDP und RCC1 beschrieben wurde. An einen  $\alpha$ -GST Antikörper, der kovalent an eine Dextranmatrix gebunden ist, wurde das GST-Fusionsprotein GST-Ran immobilisiert. Ein Komplex mit RCC1 wurde erzeugt, indem das GEF über die Ran enthaltene Dextranmatrix gespült wurde und sich dort an Ran anlagern konnte. Nach Abschluss der Anlagerungsreaktion wurde die Oberfläche des Dextransensorchips unter kontinuierlichen Pufferfluss gesetzt. Die Betrachtung der Dissoziation des Ran-RCC1-Komplexes in Abwesenheit des Nukleotids ist so möglich.

Dem Spülpuffer wurde jeweils Sulfat oder Phosphat zugesetzt und die Dissoziationsphase unter diesem Einfluss vergleichend untersucht. Das Resultat dieser Untersuchung ist in Abbildung 41 dargestellt. Es zeigt eine reduzierte Dissoziation unter dem Einfluss des

Sulfats. Die hieraus zu entnehmende Stabilisierung des Komplexes unterstützt die Vermutung, daß das Polyanion in der Kristallstruktur von Ran und RCC1 ein Sulfat ist.



**Abbildung 41: Dissoziation des immobilisiertem GST-Ran-RCC1-Komplexes unter dem Einfluss verschiedener Polyanione.** Anti-GST Antikörper wurden kovalent an die Oberfläche eines BIAcore-Sensorchips gebunden. Diese Antikörpermatrix bindet den GST-Anteil von GST-Ran-GDP nahezu irreversibel und immobilisiert so Ran an der Sensoroberfläche. Durch die Zugabe von RCC1 (200 nM) konnte ein Komplex aus GST-Ran und RCC1 gebildet werden. Dargestellt ist die beobachtete Dissoziationsphase von GST-Ran und RCC1 während des Spülvorgangs mit Hepes-Puffer (schwarz), dem Zusatz von 10 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (rot) und 10 mM KPi (blau). Die Messung wurde bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5 durchgeführt.

### 3.1.5 Biologische Aktivität und Relevanz im Importmechanismus

#### 3.1.5.1 *In vivo* Importassay

In den vorangegangenen Messungen wurde der Einfluss gezielt in Ran eingeführter Mutationen auf die Ran-RCC1-Interaktion untersucht. Dies war durch die Betrachtung der isolierten Nukleotidaustauschreaktion, unabhängig vom Einfluss weiterer (für den Kernimport notwendiger) Faktoren möglich. Der Einsatz dieser Ran-Mutanten in einem *in vivo* Kern-Importassay ermöglicht die Ermittlung des Einflusses auf das Kerntransportsystem. Ein Vergleich der Resultate dieser zwei unterschiedlichen Versuchsansätze ermöglicht eine Aussage darüber, welche Bedeutung die Ran-RCC1-Interaktion für das nukleo-cytoplasmatische-Transportsystem hat. Um gleichzeitig eine Aussage bezüglich der Stabilität des Importsystems, abhängig von der Ran-RCC1-Interaktion machen zu können, wurden für die Beantwortung diese Fragestellung Ran-Mutanten mit verschieden stark reduzierter katalytischer Nukleotidaustauschgeschwindigkeit und nur gering veränderter Affinität vergleichsweise zum Wildtyp verwendet.

**Tabelle 7: Kinetische Daten zum RCC1-katalysierten Nukleotidaustausch an Ran-mGDP der verschiedenen Ran- und RCC1-Mutanten.**

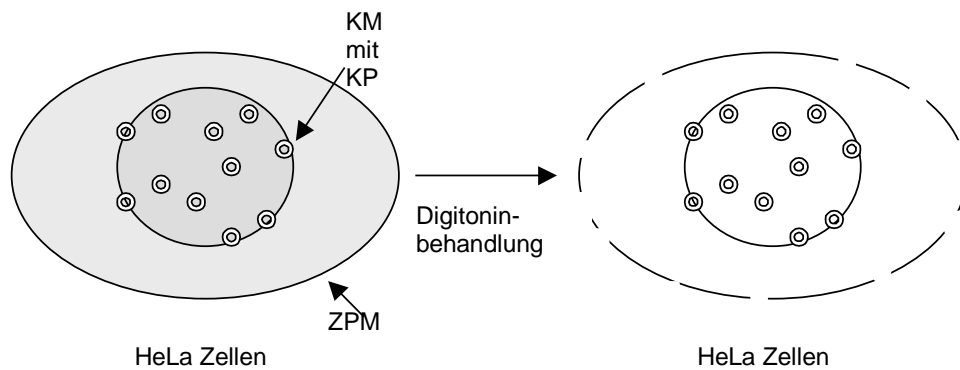
	$K_M$ [ $10^{-6}$ M]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_M$ [ $10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ ]
Wildtyp-Protein	6,4	37	5,78
RanV45I	1,4	28	20,00
RanE70A	2,8	1,2	0,43
RanK99A	7,4	3,7	0,50
RanK130A	3,5	21	6,00

Auszug aus Tabelle 5

Der Importassay basiert auf Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen (Adam et al., 1990). Kultivierte HeLa-Zellen werden mit Digitonin behandelt, um selektiv in cholesterinreichen Membranen Löcher zu erzeugen (Colbeau et al., 1971). Hiervon ist nur die Plasmamembran betroffen und nicht die Membran der Kernhülle. Durch Digitoninbehandlung und nachfolgende Waschschrte werden nach und nach fast alle löslichen Bestandteile aus dem Zytoplasma gewaschen. Zudem werden auch die löslichen Bestandteile des Kernplasmas herausgewaschen, die aufgrund ihrer Größe die Kernpore passieren können. Proteine, die an makromolekulare Strukturen wie Membranen oder DNA assoziiert sind, werden durch diese Prozedur nicht aus der Zelle herausgelöst. Zu diesen gehören die Bestandteile des Kernkomplexes (NPC), der nach Digitoninbehandlung intakt bleibt, oder das Chromatin-assoziierte RCC1 (Seino et al., 1992, Yamada et al., 2001). Immunfluoreszenzmarkierungen und Westernblott-Experimente zeigen, daß zelluläres Ran, das sich in normalen Zellen überwiegend im Kern befindet (Bischoff und Ponstingl 1991; Ren et al.,

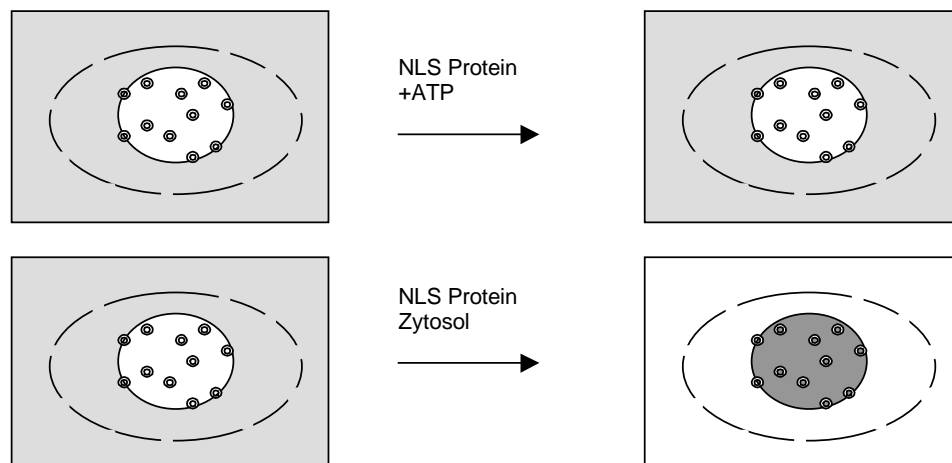


1993; Melchior et al., 1995), durch die Permeabilisierung zu über 90% aus der Zelle entfernt werden kann (Melchior et al., 1995; Görlich et al., 1995; Moore und Blobel 1995).



**Abbildung 42: Prinzip der Digitonin-Permeabilisierung:** Die Digitonin-Behandlung der HeLa-Zellen permeabilisiert selektiv die Plasmamembran und nicht die Kernhülle. Die Zelle verliert so fast alle löslichen Bestandteile (grau) des Zyto- und Kernplasmas; zellassozierte Bestandteile bleiben in der Zelle (ZPM = Zytoplasma-membran; KM = Kernmembran; KP = Kernpore).

Verwendet man mit Digitonin permeabilisierte Zellen und fügt diesem Ansatz nur ein ATP-generierendes System und ein Protein mit NLS (nuclear localisation sequence; Kern-Lokalisierungs-Sequenz) hinzu, führt dies nicht zum Import des Proteins (Melchior et al., 1995; Chi et al. 1996), da wesentliche Faktoren des Transportsystems aus der Zelle herausgewaschen worden sind. Ergänzt man jedoch die für den Import notwendigen Transportfaktoren oder ein Zytosolextrakt aus HeLa Zellen, kann die Importreaktion ablaufen.



**Abbildung 43: Prinzip des in vivo Import-Assays mit Digitonin-permeabilisierten Zellen.** (Symbole s. Abbildung 42)

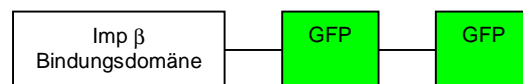
Für Importexperimente wurden HeLa-Zellen in einer kontinuierlichen Kultur gehalten. Einige Tage vor Versuchsdurchführung wurden die Zellen in Kulturschalen auf Deckgläsern ausgesät, wodurch sie auf den Glasträgern anwachsen konnten. Unmittelbar vor der Permeabilisierung wurden die Zellen durch mehrfaches Waschen mit Transportpuffer vom

Medium befreit. Anschließend wurde eine frische Digitoninlösung für die Permeabilisierung zu den Zellen gegeben. Nach kurzer Inkubation (12 min) wurde die Reaktion durch Entnahme des Permeabilisierungspuffers gestoppt und mit Puffer wiederum mehrfach gewaschen. Die bei dieser Durchführung unter permanenter Eiskühlung stehenden Zellen waren dann für den Importassay einsetzbar. Die für den Import notwendigen Faktoren (z. B. Proteine, ATP und Succrose) wurden in einem sogenannten Pre-Mix zusammengegeben, aufgeteilt und jeweils die entsprechende Ran-Mutante zur Vorinkubation hinzugegeben.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Deckgläschen mit den permeabilisierten Zellen in eine dafür vorgesehene Spannvorrichtung eingesetzt und eine Dextranlösung (Texas red Dextran) zu den Zellen gegeben. Dextran färbt die Zelle mit Ausnahme des Zellkerns an und stört den Versuchsablauf nicht. Seine Anregungs- und Emissionswellenlängen liegen bei 488 nm bzw. 508 nm. Mit Hilfe dieser Vorfärbung wurden die Zellen zunächst in den Focus des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops gebracht, so daß die Reaktion unmittelbar nach Zugabe des Reaktionsansatz verfolgt werden konnte. Es war hierdurch möglich, nicht nur die Endresultate einer abgeschlossenen Importreaktion oder Importreaktionen in verschiedenen Zellen, deren Importprozess gestoppt wurde zu vergleichen, sondern Echtzeitaufnahmen des Imports zu erhalten.

Zu Beginn jeder Meßserie wurde das Meßsystem unter Einsatz einer Positivkontrolle mit Ran-Wildtyp optimiert. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität der Endphase des Reaktionsablaufs mit Ran-Wildtyp genutzt, um die entsprechenden Systemeinstellungen vorzunehmen (z. B. Belichtungszeit, Laserintensität). Die hierbei festgelegten Einstellungen wurden im Verlauf der nachfolgenden Messungen nicht mehr variiert.

Das Prinzip der Messung basiert auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, das durch Anregung eines GFP (Grün Fluoreszierendes Protein, Green Fluorescent Protein) markierten Proteinkonstrukts, bestehend aus der Importin-beta Bindungsdomäne von Importin-alpha, generiert wird (Diese Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Dirk Görlich zur Verfügung gestellt.). Faktisch wurden zwei aufeinanderfolgende GFP Anteile in das Fusionsprotein eingebaut.

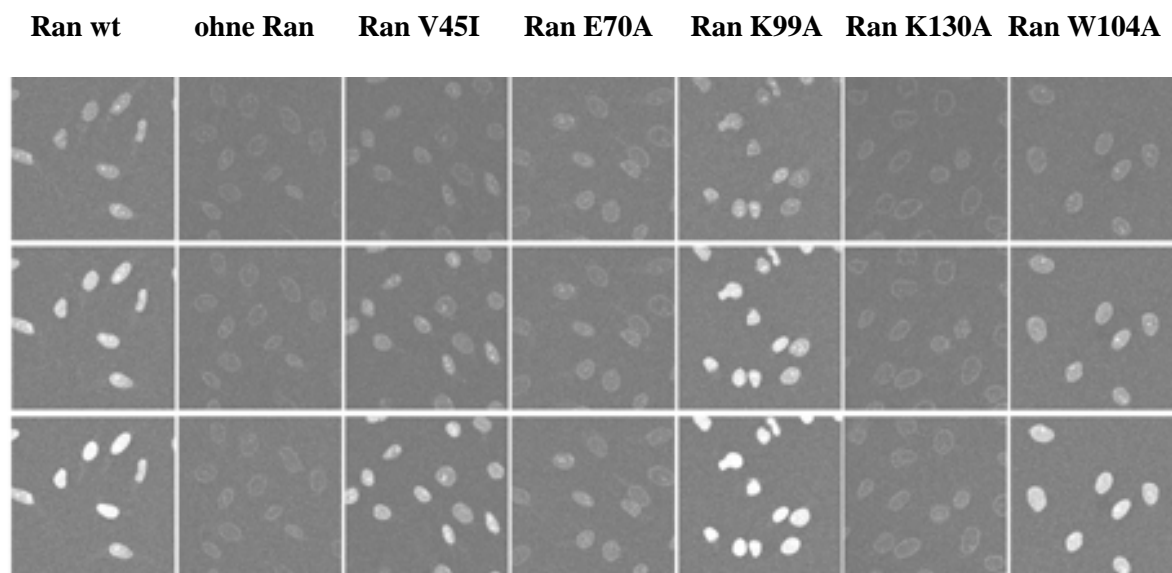


**Abbildung 44: Schematische Darstellung des Fusionsproteins aus der Importin-beta-Bindungsdomäne und zwei aufeinanderfolgender Grün-Fluoreszierende-Proteine**

Die Fusion zweier GFP-Proteine an die Importin-beta-Bindungsdomäne hat zum einen den Vorteil einer verstärkten Fluoreszenz und erhöht zum anderen das Molekulargewicht des Konstrukts derart, daß das Fusionsprotein aufgrund seiner Größe nicht mehr in den Kern diffundieren kann und aktiv transportiert werden muss.

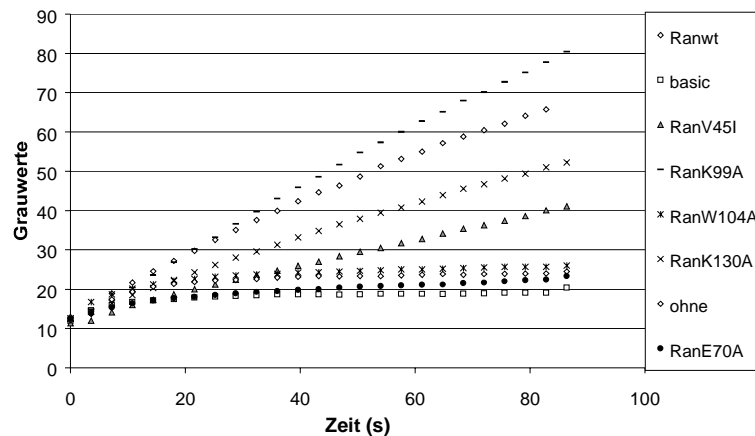
Die Importin-beta-Bindungsdomäne (IBB) selbst interagiert nicht mit Ran. Sie entstammt dem Adapterprotein Importin-alpha was die Bindung zwischen NLS-Protein und Importin-beta als eigentlichen Importfaktor vermittelt. Importin-alpha selbst exponiert seine IBB erst nach der Bindung einer NLS bzw. nach Bindung eines NLS enthaltenen Proteins und wird infolge dessen von Importin-beta gebunden und importiert. Das Fluoreszenzsignal reflektiert also keine direkten Interaktionen des GFP-Konstruktes mit den eingesetzten Ran-Mutanten, sondern zeigt den Importin-beta vermittelten Transport. Letztlich tragen damit alle Interaktionen von Ran mit seinen regulatorischen Elementen zur Effizienz des Imports bei. Dies ermöglicht einen globalen Einblick auf den Einfluss der ausgewählten Mutationen in Ran auf den nukleo-zytoplasmatischen Transport. Primäre Fragestellung war hier, ob die Störungen der Ran-RCC1-Interaktion einen Einfluss auf die Stabilität dieses Transportsystems haben.

Um eine reproduzierbare Versuchsdurchführung zu gewährleisten wurden neben den apparativen Parametern (s.o.) weitere Faktoren festgelegt. So wurden alle Mutanten an einem Tag mit der gleichen Charge frisch permeabilisierter Zellen vermessen. Die zeitliche Abfolge der Proben wurde dann bei der nächsten Versuchsdurchführung (wiederum mit frischen Zellen) umgekehrt. Hierdurch wurde versucht der Einfluss des zeitlichen Verfalls der Zellen auf den Importassay so weit wie möglich auszugleichen. Die erhaltenen Aufnahmen sind beispielhaft in Form von drei Zeitpunkten einer Messreihe in Abbildung 45 dargestellt und zeigen die Zunahme der Fluoreszenz im Kern.



**Abbildung 45: Ran-abhängiger Kernimport des Importin-beta-Bindungsdomäne-GFP-Konstruktes (IBB-GFP).** In permeabilisierten HeLa-Zellen wurde der Import von IBB-GFP [2  $\mu$ M] in Abhängigkeit von verschiedenen Ran-Mutanten mit einem Laserscanning-Mikroskop 90 s verfolgt. Dargestellt sind drei Zeitpunkte aus der jeweiligen Messreihe mit den verschiedenen Ran-Mutanten (von oben: Zeitpunkt der Zugabe, 45 s und 90 s). (v. l. n. r.: Ran-Wildtyp; Negativkontrolle ohne Ran; RanV45I; RanE70A; RanW104A; RanK99A; RanK130A). Zu Mess- und Pufferbedingungen siehe Material und Methoden.

Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit Hilfe der Zeiss KS 300 Software. Hiermit konnte die Fluoreszenzzunahme die in Form von Grauwerten erhalten wurde in numerischer Weise dargestellt werden. Durch Segmentierung (über Binärbilderzeugung) war es möglich; eine graphische Maske zu erstellen, die eine gezielte densitometrische Auswertung der Kernfluoreszenz zuließ. Diese Fluoreszenzeinheiten wurde dann gegen die Zeit aufgetragen (s. Abbildung 46).



**Abbildung 46: Zeitabhängige Zunahme der Kernfluoreszenz.** Numerische Darstellung der aus Abbildung 45 hervorgegangenen Kernfluoreszenzzunahme in Abhängigkeit zur Zeit (von oben: Ran-Wildtyp; Negativkontrolle ohne Ran; RanV45I; RanE70A; RanK99A; RanW104A; RanK130A).

Aus den Kurven kann entnommen werden, daß die anfänglichen Importgeschwindigkeiten durch die einzelnen Ran-Mutanten in unterschiedlich starker Weise beeinflusst werden. Sie lassen jedoch auch erkennen, daß der Sättigungsbereich und damit das Ende der Importreaktion noch nicht erreicht ist. Der Verlauf einer vollständigen Importreaktion äußert sich normalerweise in Form einer Kurve die durch eine monoexponentielle Funktion ausgedrückt werden kann (Ribbeck et al., 2001). Aus dieser Funktion kann die Geschwindigkeitskonstante „k“ entnommen werden die in Abhängigkeit zur Amplitude ( $A_0$ ) steht. „k“ gilt als Maß für die Importgeschwindigkeit und kann für den Vergleich des Einflusses der Ran-Mutanten auf die Importreaktion herangezogen werden. Die Ermittlung dieser Geschwindigkeitskonstanten „k“ durch einen monoexponentiellen Angleich ist aufgrund der noch nicht erreichten Sättigung und der so fehlenden Amplitude ( $A_0$ ) nicht möglich.

$$f(t) = A_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Gleichung 30

Aufgrund des Versuchsaufbaus und der Art der Reaktion kann jedoch davon ausgegangen werden, daß die Fluoreszenzzunahme bei allen Messungen innerhalb eines Ansatzes gleich ist und somit als Konstante angesehen werden kann. Bei der gemessenen Importreaktion handelt es sich nicht um eine Gleichgewichtsreaktion, sondern um einen gerichteten

Import. Sowohl der Export kann aufgrund fehlender Exportfaktoren nicht durchgeführt werden, als auch die Diffusion des Fusionsproteins kann aus den oben beschriebenen Gründen nicht stattfinden. Dadurch wird die fluoreszierende IBB zwar zeitabhängig aber gleichgewichtsunabhängig in den Kern importiert. Die Konsequenz ist, daß die maximale Fluoreszenzzunahme und somit die maximale Amplitude ( $A_0$ ) in allen Ansätzen einer Messreihe gleich ist. Für die monoexponentielle Funktion ergibt sich durch eine konstante Amplitude, daß die Steigung zur Zeit „ $t_0$ “ proportional zu „ $k$ “ ist. Dies kann der folgenden Ableitung (Formel X) entnommen werden.

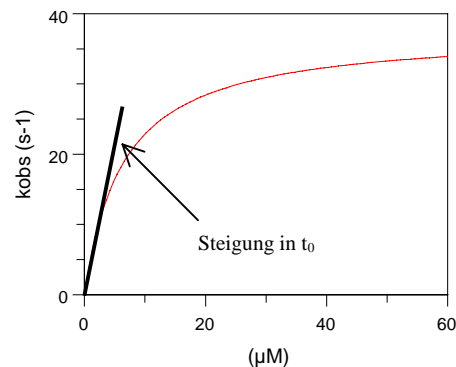
$$f(t) = (A_0 - B_0) - A_0 \cdot e^{-kt}$$

$$f'(t) = -A_0 \cdot (-k) \cdot e^{-kt}$$

$$f'(t) = A_0 \cdot k \cdot e^{-kt}$$

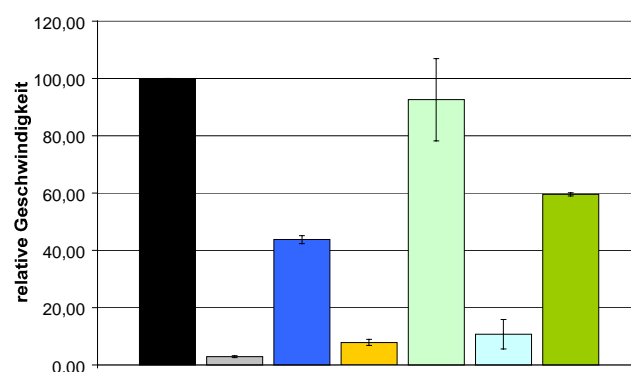
$$f'(t_0) = A_0 \cdot k \cdot 1$$

Steigung ist proportional zu  $k$ ,  
wenn  $A_0$  konstant ist.



Gleichung 31

Da die Steigung in „ $t_0$ “ direkt proportional zu „ $k$ “ ist, kann ein Vergleich der Steigungen näherungsweise in „ $t_0$ “ stattfinden. Aus den ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten ging jedoch hervor, daß ein direkter Vergleich der verschiedenen Messreihen aufgrund unterschiedlicher Geschwindigkeiten ebenfalls nicht ohne weiteres möglich war. Erst eine Normierung dieser Werte bezogen auf die ermittelte Geschwindigkeit die aus dem Ran-Wildtyp Ansatz hervorging, ließ einen Vergleich zu (s. Abbildung 47).



**Abbildung 47: Normierte Importgeschwindigkeiten der verschiedenen Ran-Mutanten.** Die aus Abbildung 46 hervorgegangenen Importgeschwindigkeiten wurden bezogen auf Ran-Wildtyp normiert und vergleichend gegeneinander aufgetragen (v. l. n. r.: Ran-Wildtyp; Negativkontrolle ohne Ran; RanV45I; RanE70A; RanK99A; RanW104A; RanK130A).

Die geringen Standardabweichung der normierten Anfangsgeschwindigkeiten unterstreicht, daß die ermittelten Daten konsistent sind und für eine Interpretation herangezogen

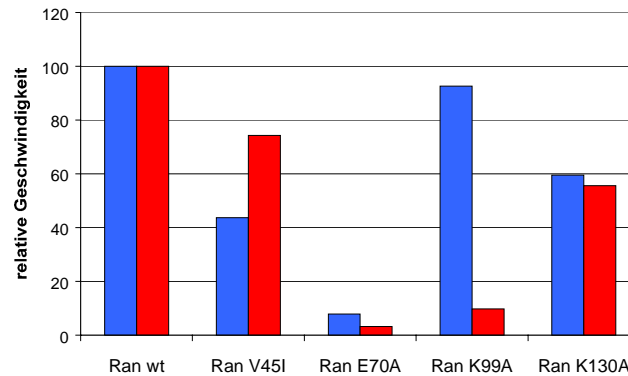
werden können. Während RanK99A einen unveränderten Import zeigt, sind bei RanV45I und RanK130A die Importraten um 40-60% reduziert. Den größten Effekt haben RanE70A und RanW104A. Bei diesen Mutanten ist die Importreaktion auf über 90% der Ran-Wildtyp-Aktivität reduziert. Die RanW104A-Mutante wurde in diesen Experimenten mit vermessen, obwohl sie in biophysikalischen Tests nicht mit Nukleotiden beladen werden konnte. Der Einbruch der Importaktivität für diese Mutante kann daher auch auf die hierdurch angezeigte fehlerhafte Nukleotidbindung zurückzuführen sein. Die Importaktivität der Negativ-Kontrolle von weniger als 3% ist auf Ran zurückzuführen, das bei der Digitoninbehandlung nicht aus den Zellen herausgewaschen wurde (s.o.).

Es konnte gezeigt werden, daß die in Ran eingeführten Mutationen das nukleozytoplasmatische Transportsystem in unterschiedlich starker Weise beeinflussen. Das Kerntransportsystem arbeitet hier nicht nach dem „Alles- oder Nichts-Prinzip“, sondern liefert eine differenzierte Antwort, die mit den spezifischen Eigenschaften der Konstrukte zusammenhängt und weist so auf eine Regulierbarkeit des gradientenbildenden Systems hin. Hierzu wurden weitere biophysikalische Interaktionsanalysen mit den Ran-Bindungspartnern RanBP1 und Importin- $\beta$  durchgeführt (s. Interaktionsanalyse Ran-mGppNHp-RanBP1 und Ran-mGppNHp-Importin-beta). RanBP (Ran Bindende Proteine) wie RanBP1 binden fest an Ran-GTP (KD ca. 1 nM) (Kuhlmann et al., 1997) und führen zu einer Co-Stimulation der RanGAP-katalysierten GTP-Hydrolyserate von Ran (Bischoff et al., 1995; Richards et al., 1995). Ihre Affinität zu Ran-GDP ist vergleichsweise gering und liegt bei ca. 10  $\mu$ M.

### 3.1.5.2 Vergleich der kinetischen Daten mit *in vivo* Daten

Die verschiedenen Ran-Mutanten haben gezeigt, daß eine mehrstufige Regulierung der Importgeschwindigkeit über das gradientbildende System möglich ist. Der Vergleich der kinetischen Daten mit den Ergebnissen aus dem Importassay gibt Aufschluss über den Einfluss der Ran-RCC1-Interaktionen und in wie weit die Nukleotidaustauschreaktion an diesem Prozess beteiligt sein kann.

Für einen Vergleich von kinetischen und *in vivo* Daten wurden die Ergebnisse aus den Ran-mGDP Dissoziationsexperimenten verwendet. Die maximalen beobachteten Austauschraten ( $k_{\text{cat}}$ ) wurden zunächst normiert, um eine Vergleichbarkeit mit den normierten Importgeschwindigkeiten zu erhalten. Die reduzierte Betrachtung von  $k_{\text{cat}}$  ist hier zulässig, da die zu vergleichenden Ran-Mutanten nur gering veränderte  $K_M$ -Werte vergleichsweise zum Wildtyp zeigten. In Abbildung 48 ist der Vergleich der relativen Daten dargestellt.



**Abbildung 48: Vergleich der relativen kinetischen Interaktionsdaten von Ran und RCC1 mit den relativen Kernimportgeschwindigkeiten.** Die in Abbildung 47 gezeigten normierten Importgeschwindigkeiten (blau) sind hier vergleichend mit den normierten maximalen RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeiten (rot) dargestellt (v. l. n. r.: Ran-Wildtyp, RanV45I, RanE70A, RanK99A RanW104 und RanK130A (s. auch Tabelle 5)).

Auffällig ist zunächst, daß lediglich zwei Mutanten vergleichbare relative Werte haben. RanK130A hat bei den kinetischen Daten eine relative Geschwindigkeit von 60% und im Importassay eine relative Geschwindigkeit von 56%. RanE70A bei der kinetischen Ermittlung 3% und 8% im Importassay (RanW104A wird aus oben genannten Gründen hier nicht in Betracht gezogen). RanV45I zeigt im Importassay eine 40% geringere relative Geschwindigkeit im Vergleich zu der kinetischen Messung. Die größte Divergenz ist bei RanK99A festzustellen. Diese Werte unterscheiden sich um 90%.

Aus diesem Vergleich wird zunächst deutlich, daß eine direkte Korrelation der verglichenen relativen Geschwindigkeiten nicht gegeben ist. Eine Reduzierung der maximal beobachteten Austauschrate steht nicht in direkter Proportionalität zur beobachteten Importgeschwindigkeit. Dies kann allein durch die Hinzunahme von RanK99A deutlich gemacht werden. Sie zeigt, daß eine Reduzierung der Austauschaktivität ( $k_{cat}$ ) um 90% nicht ausreicht, um die Importgeschwindigkeit signifikant zu reduzieren oder ganz zu unterbinden. Als Konsequenz, kann die Reduzierung der Importgeschwindigkeit durch RanV45I und RanK130A nicht auf die Ran-RCC1-Interaktionen zurückzuführen sein. In diesen Fällen müssen Wechselwirkungen mit weiteren Interaktionspartnern beeinträchtigt sein (s. Interaktionsanalyse Ran-mGppNHp-RanBP1 und Ran-mGppNHp-Importin-beta). Eine Interpretation der RanE70A-Mutante ist daher ebenfalls nur bedingt möglich. Es ist durchaus möglich und vorstellbar, daß eine Reduzierung der katalytischen Aktivität um das 31fache (97%) dazu führt, daß der Gradient nicht mehr aufrechterhalten werden kann oder gar nicht erst aufgebaut wird. Es kann allerdings auch hier nicht ausgeschlossen werden, daß Wechselwirkungen mit anderen Interaktionspartnern gestört sind und eine Reduzierung der Importgeschwindigkeit auf diese zurückzuführen sind.

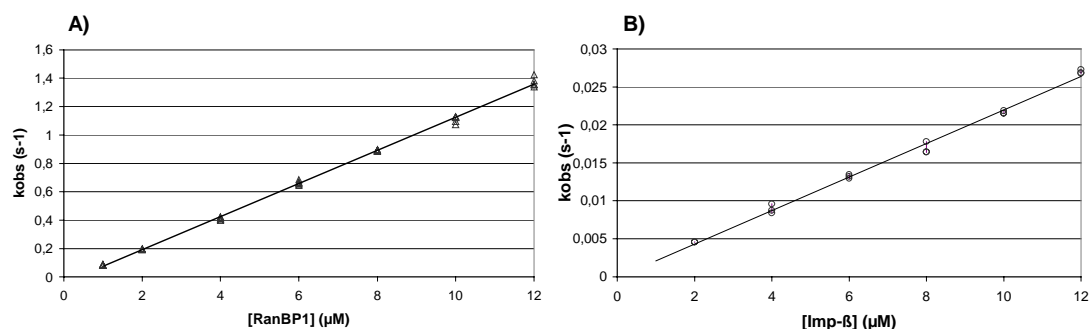
Diese vergleichende Untersuchung zeigt auf, daß der Ran-GTP-Gradient zwischen Kern und Zytoplasma aus der Sicht der Ran-RCC1-Interaktionen ein sehr störungsunanfälliges, robustes System darstellt. Ein System, das bei Reduzierung der maximalen

beobachteten Austauschgeschwindigkeit um das 10fache (90%) ohne Reduzierung der Importgeschwindigkeit arbeitet.

### 3.1.5.3 Interaktionsanalyse Ran·mGppNHp-RanBP1 und Ran·mGppNHp-Importin-beta

Aus dem oben beschriebenen Vergleich der kinetischen Interaktionsanalyse von Ran·mGDP und RCC1 mit den ermittelten Importgeschwindigkeiten des Fusionsproteins ist die fehlende direkte Vergleichbarkeit hervorgegangen. Sie ist auf die Komplexität des Transportvorgangs zurückzuführen, in den mehrere Interaktions- und Bindungspartner involviert sind, die mit Ran interagieren. Um veränderte Bindungseigenschaften mit importrelevanten Interaktionspartnern wie beispielsweise RanBP1 oder Importin-beta nachzuweisen, wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die entsprechenden Ran-Mutanten mit einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogen (mGppNHp) beladen, das zur Detektion die gleiche fluorophore Mant-Gruppe enthielt wie das in den vorausgegangenen Experimenten eingesetzte mGDP. Aufgrund der Fluoreszenzzunahme, die durch die Bindung von RanBP1 bzw. Importin-beta bewirkt wird, konnte die Assoziation und Dissoziation an oder von Ran·mGppNHp detektiert werden.

Im Stopped-Flow konnten durch das Einsetzen steigender Konzentrationen an RanBP1 bzw. Importin-beta verschiedene Geschwindigkeitskonstanten unter Bedingungen pseudo erster Ordnung ermittelt werden. Diese beobachteten Geschwindigkeiten gegen die jeweils eingesetzte Konzentration aufgetragen ergaben eine Gerade, deren Steigung die Assoziationsgeschwindigkeit  $k_{on}$  darstellte.

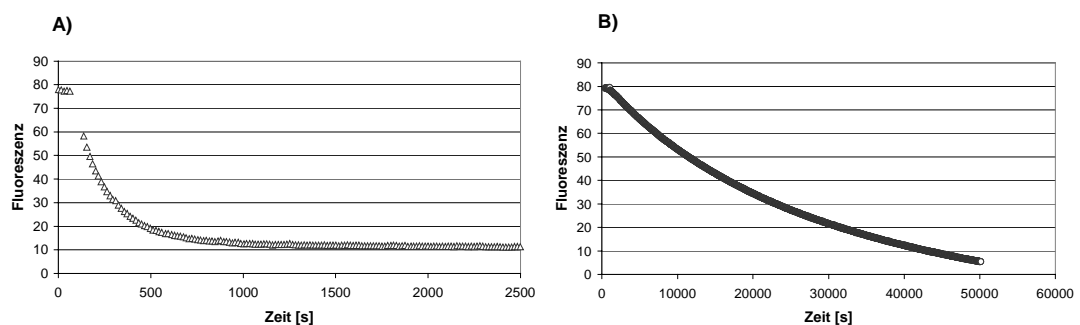


**Abbildung 49: Assoziation von Ran·mGppNHp mit RanBP1 und Ran·mGppNHp mit Importin-beta<sub>1-462</sub>.** 0,2 µM RanV45I-mGppNHp wurden **A)** mit 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 µM RanBP1, bzw. **B)** mit 2, 4, 6, 8, 10, 12 µM Importin-beta<sub>1-462</sub> in der Stopped-Flow-Apparatur in einem 1:1-Verhältnis gemischt und die Assoziation durch die Zunahmen der Fluoreszenz verfolgt. Durch einen einfach-exponentiellen Angleich wurden die Ratenkonstanten erhalten. Sie sind gegen die RanBP1-Konzentration bzw. gegen die Importin-beta<sub>1-462</sub>-Konzentration aufgetragen und an eine lineare Funktion angeglichen ( $k_{on \text{ RanV45I-mGppNHp RanBP1}} = 1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) ( $k_{on \text{ RanV45I-mGppNHp Importin-beta}} = 2,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Die Messung wurde bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5 durchgeführt. Anregung: 350 nm, Emission: KV 408.

Die Bestimmung der langsameren Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation konnte mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers erfolgen.  $k_{off}$  wurde bestimmt, indem Ran·mGppNHp durch einen 10fachen Überschuß des jeweiligen Interaktionspartners einen



Komplex bildete, dessen Dissoziation nach Zugabe eines 20fachen Überschusses an unmarkiertem Ran-GppNHp beobachtet werden konnte. Dissoziiertes RanBP1 bzw. Importin-beta wird durch den deutlichen Überschuß an Ran-GppNHp abgefangen und steht daher nicht wieder für eine Bindung an fluoreszierendes Ran zur Verfügung, so daß die Dissoziation direkt über die Fluoreszenzveränderung verfolgt werden kann. Ein paralleler Ansatz, in den kein Überschuß unmarkiertes Ran zugegeben wurde, zeigte daher einen von der kinetischen Dissoziation unabhängigen Fluoreszenzverlust. Hierdurch war es möglich, eventuell aufgetretene Geräteschwankungen, die innerhalb der Langzeitmessung auftraten und sich auf alle zu vermessenden Proben auswirkte, zu ermitteln. Durch Subtraktion beider Werte voneinander konnten diese eliminiert werden. Der einfach-exponentielle Angleich der erhaltenen Kurven lieferte die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation.



**Abbildung 50: Dissoziation des Ran-mGppNHp-RanBP1- und des Ran-mGppNHp-Importin-beta 1-462-Komplexes.** 0,2  $\mu\text{M}$  RanV45I-GppNHp wurden A) mit 2  $\mu\text{M}$  RanBP1 bzw. B) mit 2  $\mu\text{M}$  Importin-beta 1-462 vorinkubiert und die Reaktion nach Zugabe von 4  $\mu\text{M}$  Ran-GppNHp im Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Durch einen einfach-exponentiellen Angleich wurde die Ratenkonstante erhalten ( $k_{\text{off}} \text{ RanV45I-mGppNHp RanBP1} = 6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) ( $k_{\text{off}} \text{ RanV45I-mGppNHp Importin-beta} = 6,8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). Die Messung wurde bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH7.5 durchgeführt. Anregung: 350 nm, Emission: 450 nm.

Für die vermessenen Ran-Mutanten wurden ebenfalls die jeweiligen Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  errechnet:

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$$

**Tabelle 8: Kinetische Daten zur Ran·mGppNHp·RanBP1- bzw. Ran·mGppNHp·Importin-beta<sub>1-462</sub>-Interaktion verschiedener Ran-Mutanten.**

	RanBP1			Importin-beta		
	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_D = k_{off}/k_{on}$ [nM]	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_D = k_{off}/k_{on}$ [nM]
Ran(WT)	*7,9 x 10 <sup>5</sup>	*1,1 x 10 <sup>-3</sup>	1,4	**1,3 x 10 <sup>4</sup>	**9,0 x 10 <sup>-6</sup>	0,7
RanV45I	1,2 x 10 <sup>5</sup>	6,0 x 10 <sup>-3</sup>	<b>49,6</b>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	6,8 x 10 <sup>-5</sup>	<b>31,1</b>
E70A	1,3 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>-3</sup>	<b>9,2</b>	9,0 x 10 <sup>3</sup>	7,5 x 10 <sup>-5</sup>	<b>8,3</b>
RanK99A	4,0 x 10 <sup>5</sup>	8,5 x 10 <sup>-3</sup>	2,1	9,4 x 10 <sup>3</sup>	2,3 x 10 <sup>-4</sup>	<b>24,2</b>
K130A	2,7 x 10 <sup>5</sup>	8,1 x 10 <sup>-4</sup>	3,0	1,5 x 10 <sup>4</sup>	8,9 x 10 <sup>-5</sup>	6,0

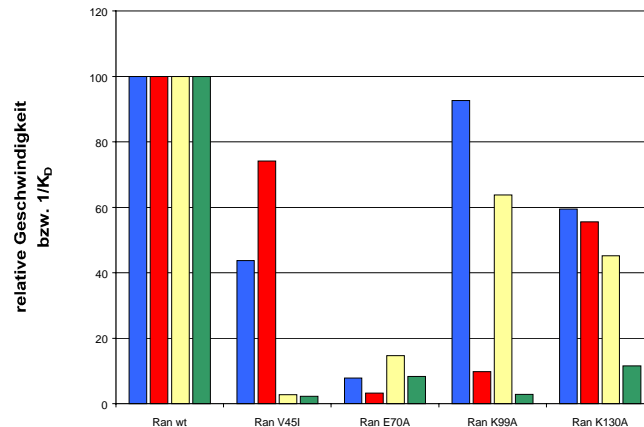
Diese Daten wurden übernommen aus \*(Kuhlmann et al., 1997) \*\*(Braslavsky et al., 2000)

Aus der Tabelle 8 kann entnommen werden, daß sich sowohl die Assoziationskonstanten als auch die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation von den ermittelten Ran·Wildtyp-Daten unterscheiden. Signifikante Veränderungen der Ran-RanBP1-Interaktion konnten jedoch nur bei RanE70A und RanV45I festgestellt werden. Die Erhöhung des  $K_D$ -Wertes um den Faktor sieben bei RanE70A ist das Resultat einer verringerten Assoziationskonstante ( $k_{on}$ ). Bei RanV45I sind sowohl  $k_{on}$  als auch  $k_{off}$  betroffen, der  $K_D$ -Wert ist hier um den Faktor 35 erhöht.

Importin-beta besitzt eine Affinität zu Ran im picomolaren Bereich, die im wesentlichen durch eine feste Bindung und weniger durch eine schnelle Assoziation erreicht wird. RanV45I mit einem 44fach erhöhter  $K_D$ -Wert und RanE70A mit einem 12fach reduzierten  $K_D$ -Wert zeigen auch in Bezug auf diese Interaktion eine signifikant reduzierte Affinität. Die Reduzierung bei RanE70A ist in diesem Fall nicht auf eine veränderte Assoziationskonstante zurückzuführen, sondern vielmehr auf einen erhöhten  $k_{off}$ -Wert. Weiterhin sind der  $K_D$ -Wert von RanK130A 9fach und von RanK99A um den Faktor 35 signifikant erhöht. Bewirkt wird dies bei RanK99A fast ausschließlich durch eine erhöhte Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation.

Ein Vergleich der Interaktionsanalysen von Ran mit RanBP1 und Importin-beta mit den aus dem Importassay ermittelten Importgeschwindigkeiten bestätigt die Vermutung, daß eine Reduzierung der Importgeschwindigkeit bei RanV45I und RanK130A nicht auf die reduzierte RCC1-katalysierte Nukleotidaustauschgeschwindigkeit ( $k_{cat}$ ) zurückzuführen ist, sondern daß dies ein Ergebnis von Interaktionsstörungen mit anderen für den Import relevanten Proteinen ist. Konkret konnte gezeigt werden, daß die Interaktion aller Ran-Mutanten mit Importin-beta gestört ist und die Interaktion mit RanBP1 für RanV45I und RanE70A. Abbildung 51 zeigt einen Vergleich der relativen Geschwindigkeiten des Kernimportassays und der RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschreaktion an Ran bzw. der relativen inversen  $K_D$ -Werte der Ran·RanBP1 und Ran·Importin-beta Interaktion. Aus

dieser Übersicht kann entnommen werden, welchen Einfluss die einzelnen Ran-Mutanten auf den jeweiligen Interaktionspartner bzw. im Kernimportassay haben.



**Abbildung 51:** Vergleich der aus dem Kernimport-Assay ermittelten relativen Geschwindigkeiten (blau) mit den relativen maximal beobachteten RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeiten an Ran (rot), dem relativen inversen  $K_D$ -Wert der Ran-RanBP1-Interaktion (gelb) und dem relativen inversen  $K_D$ -Wert der Ran-Importin-beta-Interaktion (grün). Die Importgeschwindigkeiten sind aus Abbildung 47 entnommen und die normierten maximalen RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeiten aus der Abbildung 48 (v. l. n. r.: Ran-Wildtyp, RanV45I, RanE70A, RanK99A, RanK130A).

Es ist zu erkennen, daß das nukleo-zytoplasmatische Transportsystem starke Beeinträchtigungen verschiedener transportrelevanter Interaktionspartner toleriert, ohne daß der Transportzyklus „unterbrochen, zerstört“ wird. Die Reduzierung der RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeit um das 10fache (90%) in Verbindung mit einer Verringerung des  $K_D$ -Werts der Ran-Importin-beta-Interaktion um das 35fache (97%) reichen nicht aus, um den Kernimport zu unterbinden. Eine Einschätzung, ob die Reduzierung der Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran durch RCC1 um das 31fache (97%) (RanE70A) den Kernimport verhindert, ist auch mit Hilfe dieser Messungen nicht möglich. Zu sehen ist, daß auch die Interaktionen mit RanBP1 und Importin-beta stark beeinträchtigt sind. Wahrscheinlich ist daher, daß für eine Reduzierung der Importgeschwindigkeit eine noch stärkere Minderung der Ran-RCC1-Interaktion erforderlich ist.

### 3.1.6 Einfluss posttranslationaler Modifikation auf den Kernimport

Die Vermutung, daß eine umfangreiche Regulation des nukleo-zytoplasmatischen Transports stattfindet, ist naheliegend, und die Möglichkeit der Regulation über das Ran-Gradientensystem konnte hier von Seiten der Stabilität und Variierbarkeit gezeigt werden. Eine Regulierung auf dieser Ebene würde sich auf den gesamten Transport auswirken und hätte allein keine Möglichkeit der selektiven Unterscheidung verschiedener Zielproteine, die in den Kern oder aus dem Kern transportiert werden müssen. Der Import oder Export aller Proteine würde durch ein derartiges System beschleunigt oder verlangsamt. Für eine selektive Regulierung und so einen kontrollierten Transport einzelner Proteine oder Proteingruppen wird ein zusätzlicher Regulationsmechanismus benötigt. Regulation des Imports durch posttranslationale Modifikation im NLS-Bereich wird schon seit längerer Zeit diskutiert (Rihs et al., 1991, Jans et al., 1991) und der Einfluss von Phosphatase-inhibitoren auf den Importin-beta vermittelten Import konnte gezeigt werden (Kehlenbach und Gerace, 2000).

Im vorliegenden Versuch wurde ein Assay etabliert, mit dem es möglich ist, Signalpeptide durch Mikroinjektion in die Zelle zu bringen und die Lokalisation zu verfolgen. Exemplarisch wurde hier der Einfluss von Phosphorylierung und Glykosylierung einer Kernlokalisierungssequenz auf den Kernimport am Peptidmodell betrachtet. Es sollten so Informationen darüber erhalten werden, ob der NLS-abhängige Transport in den Kern durch derartige Modifikationen reduziert oder unterbunden werden kann.

Die Synthese der v-Jun Kernlokalisierungssequenz (Tagawa et al., 1995) in normaler, in phosphorylierter und in glykosylierter Form sollte verschiedene posttranslational modifizierte Zustände in diesem Bereich darstellen. Innerhalb eines Kooperationsprojekts wurde die oben beschriebene Kernlokalisierungssequenz in den verschiedenen modifizierten Zuständen von Stefanie Schlummer synthetisiert. Durch Mikroinjektion dieser Peptide in BHK-21-Zellen und mikroskopische Betrachtung wurde der Import untersucht.

Um den Import mit dem Mikroskop verfolgen zu können, besaßen die Peptide einen NBD-Rest (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol) als fluorophore Gruppe, der über einen aca- (Amino-aproic-acid) Linker mit der Peptidkette verbunden war. Zwischen dem Linker und der NLS befanden sich drei Aminosäuren (SKS), von denen die dritte, ein Serin, die Phosphorylierungs bzw. die Glykosylierungsstelle darstellte.

- 1) NBD-aca-SKS RKRKLGG-OH
- 2) NBD-aca-SKS<sup>P</sup>RKRKLGG-OH
- 3) NBD-aca-SKS<sup>G</sup>RKRKLGG-OH

P = -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>

G = Glukoserest

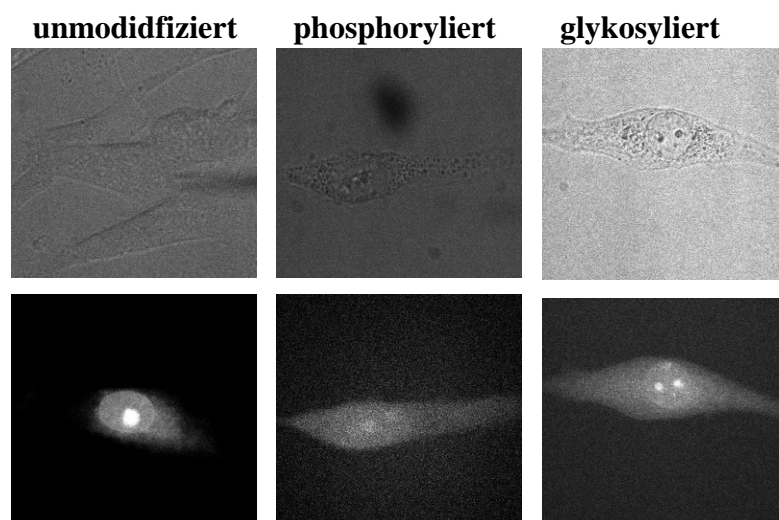
Die für dieses Experiment verwendeten BHK-21-Zellen wurden in einer kontinuierlichen Kultur gehalten. Einige Tage vor Versuchsdurchführung wurden sie in Kulturschalen auf Deckgläsern ausgesät, wodurch sie auf den Glasträgern anwachsen konnten. Die mit Zellen

bewachsenen Deckgläschen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn in eine dafür vorgesehene Spannvorrichtung eingesetzt. Die Spannvorrichtung bildete durch ihre Ränder ein Gefäß mit dem Deckglas als Boden. Durch diese Konzeption war es möglich, die Zellen unter physiologischen Bedingungen in Medium oder Puffer unter dem Mikroskop zu betrachten und die Injektion der Peptide durchzuführen. Die Peptide wurden mit Hilfe einer pneumatisch regulierbaren Mikroinjektionsnadel, die über einen Mikromanipulator gesteuert wurde in die Zellen injiziert. Hierfür wurden die Peptide in Import-Puffer gelöst. Mit Hilfe eines Nikon-Lasermikroskopes und einem Argon-Krypton Lasers, der das fluoreszierende Peptid mit Licht der Wellenlänge 488 nm anregte, konnte die Injektion verfolgt werden.

Die Versuchsdurchführung gestaltete sich aufgrund verschiedener Aspekte schwierig. Die Verfolgung der Fluoreszenz und somit die Lokalisation der Peptide war zwar grundsätzlich möglich, die Quantenausbeute des eingesetzten Fluorophors war allerdings in den eingesetzten Konzentrationen relativ gering und wurde durch die Einstrahlung des Lasers schnell ausgeblüht. Die Verwendung höherer Konzentrationen war nicht möglich, da bei diesen Konzentrationen die Injektionsnadel verstopfte.

Als weiterer Punkt bei der Verteilung der Peptide nach der Injektion, muß deren verhältnismäßig geringe Größe (ca. 1,4-1,6 kDa) berücksichtigt werden. Proteine bis zu einer Größe von ca. 60 kDa sind in der Lage, unabhängig vom Transportsystem durch die Kernpore in den Kern zu gelangen. Die Peptidverteilung nach der Injektion stellt dadurch eine Überlagerung von aktivem Import und Diffusion dar.

### NLS:



**Abbildung 52: Mikroinjektion verschieden modifizierter v-Jun Kernlokalisationssequenzen in BHK-21-Zellen.** Es wurden die unmodifizierte (links), die phosphorylierte (Mitte) und die glykosylierte (rechts) v-Jun Kernlokalisationssequenzen (20  $\mu$ M) in BHK-21-Zellen injiziert und die Verteilung innerhalb der Zelle mit einem Laserscanning-Mikroskop verfolgt. Die Zellen befanden sich in ihrem Kulturmedium und wurden während des Experiments bei Raumtemperatur gehalten (oben = Hell-Feldaufnahme, unten = Fluoreszenzaufnahme).

Die Mikroinjektion der normalen und der durch Phosphorylierung bzw. Glykosylierung modifizierten Kernlokalisationssequenz in BHK-21-Zellen ermöglichte die Betrachtung und einen bedingten Vergleich des Imports dieser Signalsequenzen.

Die in Abbildung 52 gezeigten Aufnahmen zeigen Zellen vor und nach der Injektion. Zu erkennen war eine Akkumulation der nicht modifizierten Sequenz innerhalb des Kerns. Die starken Anfärbungen einzelner Bereiche sind Nukleoli. Nukleoli sind Regionen intensiver RNA-Synthese (besonders ribosomale RNA), wobei durchaus mehrere Nukleoli im Zellkern vorkommen können. Die Akkumulation in diesem Bereich ist auf spezifische oder unspezifische Bindungsstellen für das Peptid zurückzuführen. Ein vergleichbares Bild in Bezug auf die Kernfluoreszenz war bei dem glykosylierten Peptid festzustellen. Der Kern und besonders die Nukleoli fluoreszierten auch hier stärker als der übrige Bereich. Im Unterschied zum unmodifizierten Peptid war die Fluoreszenz erkennbar im ganzen Zytoplasma verteilt. Die dritte Kernlokalisationssequenz, bei der das Serin phosphoryliert war, zeigte eine überwiegend gleichmäßig im Zytoplasma verteilte Fluoreszenz. Der Zellkern und die Nukleoli waren nur andeutungsweise zu erkennen.

Die Überlagerung von Diffusion und aktivem Transport erschwert eine eindeutige biologische Aussage über die Funktionalität der unterschiedlichen Peptide. Der Umstand, daß die Peptide innerhalb des Zellkerns an Nukleoli gebunden werden, ermöglicht möglicherweise eine Auswertung des Importverhaltens. Mit der Bindung der Peptide im Bereich des Zellkerns wird die Diffusion aus dem Kern stark reduziert. Dadurch ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei Proteinen größer 60 kDa, die den Zellkern aufgrund ihrer Größe nicht verlassen können. Die Peptide können zwar anders als große Proteine ungehindert in den Kern diffundieren, der aktive Transport unterstützt jedoch diesen Prozess und bewirkt eine schnellere Akkumulation der Peptide im Kern. Auszuschließen ist jedoch nicht, daß die unterschiedliche Akkumulation im Bereich der Nukleoli im wesentlichen auf unterschiedliche Affinität des jeweiligen Peptids zu den Bindungsstellen im Nukleoli zurückzuführen ist. In diesem Fall kann keine Aussage über das Importverhalten, sondern lediglich über das Bindungsverhalten der Peptide getroffen werden.

Der Vergleich zeigt den Unterschied zwischen der überwiegend von Diffusion geprägten Verteilung des phosphorylierten Peptids und des im Kern akkumulierten unmodifizierten Peptids. Eine gleichmäßige Verteilung des phosphorylierten Peptids über den ganzen Zellbereich zeigt das charakteristische Resultat einer freien Diffusion. Es kann also vermutet werden, daß eine Phosphorylierung des Serins den aktiven Import und/oder die Affinität zu den Bindungsstellen in den Nukleoli reduziert. Ob der aktive Import unterbunden wird, kann aus diesen Ergebnissen nicht entnommen werden. Die Importeffizienz oder die Affinität des glykosylierten Peptids liegt möglicherweise zwischen der des unmodifizierten und der des phosphorylierten Peptids. Die Akkumulation im Bereich des Kerns ist stärker, als bei der phosphorylierten Sequenz, aber schwächer als bei der unmodifizierten.




Um eine eindeutige Aussage bezüglich des Importverhaltens der unterschiedlich modifizierten NLS-Sequenzen zu erhalten, ist es erforderlich ein diffusionsbedingtes Eindringen in den Kern zu unterbinden. Den Ergebnissen kann daher lediglich entnommen werden, daß die Phosphorylierung der Kernlokalisationssequenz eine verringerte Akkumulation im Zellkern bewirkte.

### 3.1.7 Vorbereitende Entwicklung eines Signal-Peptid vermittelten Transportsystems

Die Mikroinjektion ist ein geeignetes Hilfsmittel, um Stoffe verschiedenster Art gezielt in Zellen zu bringen. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß zum einen die Zahl der injizierten Zellen aufgrund der sehr zeitaufwendigen Methode begrenzt ist, zum anderen eignet sich eine solche Methode weiterführend nicht für mehrzellige Organismen. Durch die Entwicklung eines Signal-Peptid vermittelten Transportsystems soll ein Werkzeug entstehen, mit dessen Hilfe Moleküle durch die Zytoplasmamembran in die Zelle und von dort aus gezielt in den Zellkern transportiert werden können. Verschiedene Experimente wurden beschrieben, bei denen ein Transport in die Zelle erreicht wurde. Es wurden Sequenzen eingesetzt, die der 60 Aminosäure langen Helix drei der Antennapedia homodomäne ähnlich waren (Derossi et al., 1994; Brugidou et al., 1995), die über die Zellmembran in die Zelle gelangen. Diese Hilfsmittel waren zwar grundsätzlich als Transportvehikel geeignet, sie waren aber zum Teil von bestimmten Zelltypen abhängig oder zeigten geringe Importaktivität. Mit der Absicht, den Import effizienter zu gestalten, folgten weitere Arbeiten, in denen ein Sequenzteil die Membranverankerung vermittelte und der andere den Kernimport (Chaloin et al., 1998; Morris et al., 1997). Die Transporteigenschaften in die Zellen wurden durch diese Peptide deutlich verbessert, doch war die Lokalisation sehr abhängig von der hydrophoben Sequenz.

Um weitere Kenntnisse über den peptidvermittelten Transport zu erhalten und ggf. den gezielten Import zu verstärken, wurde ein andersartiges amphipathisches Peptid konstruiert und im Zellexperiment getestet. (Diese Arbeit ist aus einer Kooperation hervorgegangen, bei der die Synthese des Peptids von Halmuthur Kumar durchgeführt wurde.) Das Peptid hatte aus chemischer Sicht den Vorteil einer kompletten Festphasensynthese von MPS (membrane penetrating sequence) und NLS (nuclear localization sequence). Aus biologischer Sicht hatte es den Vorteil einer reversibel bindenden MPS und eines vier Aminosäure langen „Spacers“, der die Beeinflussung von MPS und NLS möglichst gering halten sollte.

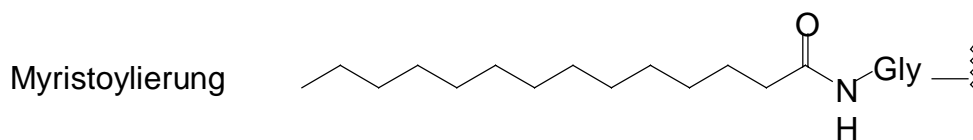
Myr-GARASVL-LGGG-KKKKK-K(Fluo)-OH

 = MPS mit Myristoylrest  
 = NLS  
 = Fluoreszein

Die MPS besteht aus einer myristoylierten Sequenz des HIV-1-Matrixproteins gag MA. Dieses lipidierte Protein ist membranassoziiert, aber in der Lage, von der Membran ab zu

dissoziieren (Burkinsky et al., 1993, Burkinskaya et al., 1996). Bei myristoylierten Peptiden konnte das Einlagern in Fibroblastenmembranen gezeigt werden (Schroeder et al., 1996).

Die bekannten myristoylierten Proteine beginnen mit der Aminosäuresequenz Met-Gly. In einem kotranslationalen Prozeß wird das Methionin von einer Aminopeptidase abgespalten. Anschließend überträgt die N-Myristoyl-Transferase das Myristat, einen geradkettigen C14-Acylrest, als Amid an das N-terminale Glycin des Proteins (Johnson et al., 1994). Als Fettsäure-Donor dient Myristoyl-CoA. Beispiele für myristoylierte Proteine sind die alpha-Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen, Mitglieder der Src-Familie, retrovirale Gag-Proteine sowie das kleine GTP-bindende Protein Arf (Boutin, 1997). Dieser Rest sollte die Membraneinlagerung unterstützen.



**Abbildung 53: Natürliche Lipidmodifizierungen von Proteine, der Myristoylrest.**

Die NLS ist aus dem Maus-Protein c-Abl (Wen et al., 1996), sie besteht ausschließlich aus Lysinresten. Zur Detektion innerhalb der Zellen wurde Fluorescein als fluorophore Gruppe an den C-terminus gehängt.

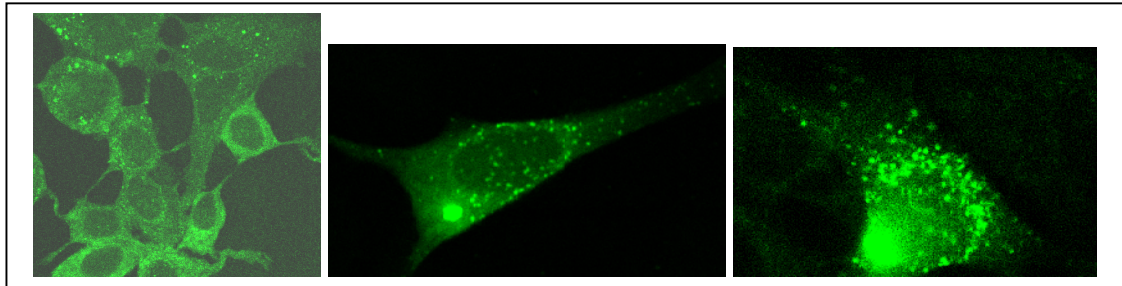
Für die Durchführung des Experiments wurden HeLa-Zellen verwendet. Sie wurden wie in den oben beschriebenen Zellkulturexperimenten, in einer kontinuierlichen Kultur gehalten und einige Tage vor Versuchsdurchführung auf Deckgläsern ausgesät, die sich in den Kulturschalen befanden. Nach einem Tag waren die Zellen auf den Glaträgern angewachsen und das Peptid wurde in das Medium gegeben.

Es wurden verschiedene Konzentrationen (Endkonzentration: 2  $\mu$ M und 8  $\mu$ M 30  $\mu$ M) zu zwei Zeitpunkten (10 min und ÜN) betrachtet. Die Zugabe des Peptids wurde als Zeitpunkt Null definiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion durch Waschen der Zellen, Formaldehydfixierung und nochmaliges Waschen gestoppt. Die fixierten Zellen wurden im Anschluß mit Mukasol auf einem Objekträger eingedeckelt und nach Aushärtung unter dem Lasermikroskop betrachtet.

Zunächst konnte festgestellt werden, daß die Zellen in einem guten Zustand waren und sich in der Morphologie von den Negativkontrollen nicht unterschieden. Eine Ausnahme bildete hier die höchste Peptidkonzentration mit 30  $\mu$ M. Hier waren die Zellen größtenteils lysiert. Es konnten nur noch Zellfragmente erkannt werden, die zum Teil fluoreszierten. Möglicherweise hat die Einlagerung zu vieler Peptide dazu geführt, daß die Zytoplasmamembran löchrig geworden ist und die Zellen lysiert sind. Das zu hohe



Peptidkonzentrationen toxisch auf Zellen wirken, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Bonnet et al., 2001).



**Abbildung 54: MPS-NLS-vermittelter Transport in HeLa-Zelle.** Ein synthetisiertes Peptid, zusammengesetzt aus der MPS des HIV-1-Matrixproteins gag MA und der NLS des Maus-Proteins c-Abl, wurde in das Kulturmedium einer wachsenden HeLa-Zellenkultur (8  $\mu$ M) gegeben und für 10 min (links) bzw. über Nacht inkubiert (Mitte, rechts) und nach Formaldehydfixierung mit einem Laserscanning-Mikroskop betrachtet.

Ein Unterschied zwischen der 2  $\mu$ M und 8  $\mu$ M Konzentrationen konnte nicht festgestellt werden. Die Fluoreszenz der Zellen zeigte, daß das Peptid in die Zellen gelangen konnte. Was jedoch nur in sehr wenigen Fällen beobachtet werden konnte, war eine Akkumulation im Kern. Zellen, die nur für kurze Zeit (10 min) mit dem Peptid inkubiert wurden, zeigten eine verhältnismäßig gleichförmige Verteilung der Fluoreszenz innerhalb der Zellen mit Aussparung des Zellkerns. Die Präparate der ÜN-Inkubation zeigten eine Akkumulation in Form von kleinen, gleichmäßig verteilten Fluoreszenz-„Hotspots“. Zusätzlich war ein großer fluoreszierender Bereich zu erkennen, der ggf. den Golgiapparat darstellt. Auch bei diesen Zellen war nur sehr selten Fluoreszenz im Kern zu erkennen, die auf einen aktiven Transport des Peptids in den Kern schließen lässt. Es konnte hier eine Akkumulation in der Kernhüllenregion festgestellt werden.

Aus den Ergebnissen kann entnommen werden, daß das verwendete Peptid in der Lage ist sich in Membranen einzulagern und hierdurch in die Zelle zu gelangen. Ein Weitertransport in den Zellkern findet nicht statt bzw. konnte nur sehr selten beobachtet werden.

Das eingesetzte Peptid gelangt aufgrund der myristoylierten Sequenz des gag MA-Proteins in die Membran. Hier ist bekannt, daß sie eine Verankerungen in der Membran vermitteln können. Ebenfalls ist bekannt, daß penta-Lysinreste von Maus-c-Abl den Kernimport unterstützten. Allerdings ist auch von lysinreichen Peptiden bekannt, daß sie sich an die Zellmembran anlagern können (Leonetti et al., 1990, Sheldon et al., 1995). Die Frage ist nun, warum das eingesetzte Peptid mit den verschiedenen Signalsequenzen nicht in den Kern transportiert wird. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß die Affinität der MPS mit ihrem Myristoylrest zur Membran durch die basische, lysinreiche Sequenz der NLS erhöht wird. Durch die verstärkte Bindung von Peptid und Plasmamembran kommt es

nur noch selten zur Dissoziation des Peptids aus der Plasmamembran in das Zytoplasma. Die geringe Dissoziationsrate und das Vorkommen weiterer Membranen innerhalb der Zellen reduzieren die Transportereignisse in den Kern. Zusätzlich verhindert die geringe Größe des Peptids nicht das Herausdiffundieren aus dem Kern. Eine Anfärbung der Nukleoli (s. Mikroinjektionsexperiment), die durch Bindung des Peptids in diesem Bereich erzeugt wird, konnte nicht beobachtet werden.

Die Vorstellung eines rein membrangebundenen Peptids, das sich anfangs gleichmäßig an der Zytoplasmamembran anlagert und dadurch eine gleichmäßige Verteilung des Fluorophors zeigt und in den über Nacht Aufnahmen das Resultat von Membrantransport innerhalb der Zelle (Kernhülle und Golgi) und gezieltem Abbau in Lysosomen ist, würde für die Verteilungsweise des Fluorophors in der Zelle sprechen.

## 4 DISKUSSION

Ein Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen der Interaktion des Ras-verwandten GTP-bindenden Proteins Ran mit seinem Guanosinnukleotid-Austauschfaktor RCC1. Ein Schritt hierbei war die Ermittlung der Röntgenkristallstruktur des Komplexes aus Ran und RCC1, bei deren Lösung durch Louis Renault innerhalb eines Kooperationsprojektes mitgearbeitet wurde (Renault et al., 2001). Auf der Grundlage dieser Struktur konnte zunächst die Bindungsorientierung von Ran an sein GEF geklärt werden. Während diese Orientierung zuvor aufgrund biochemischer Messungen (Azuma et al., 1999) und durch Modellierungsexperimente mit Ran und RCC1 (Renault et al., 1998) nur abgeschätzt werden konnte, lieferte die Struktur des Komplexes weitere für die Interaktion wichtige Befunde und legte die durch die Komplexbildung entstandenen Kontaktflächen offen.

Die für den Kontakt zwischen Ran und seinem Austauschfaktor wichtigen Bereiche konnten sowohl von Ran als auch für RCC1 ermittelt werden. Hierbei wurde festgestellt, daß seitens Ran der P-Loop, Switch-II, alpha-Helix-3 und alpha-Helix-4 mit dem Austauschfaktor in Kontakt treten, nicht aber Switch-I. Dieses steht im Gegensatz zu anderen Komplexen von GTPasen mit ihrem GEF (Boriack-Sjodin et al., 1998; Goldberg, 1998; Worthylake et al., 2000).

Seitens des Austauschfaktors steht jedes Blatt der Propellerstruktur von RCC1 mit der GTPase in Verbindung. Insgesamt stehen 24 Aminosäurereste von Ran und 25 Aminosäurereste von RCC1 mit dem jeweiligen Interaktionspartner in Verbindung.

Die Komplexstruktur bestätigte, daß das aus RCC1 hervortretende extra beta-Faltblatt ein starres Gebilde ist, das durch die Ran-RCC1-Interaktion nahezu keine Veränderungen erfährt. Hierbei hatte bereits die RCC1-Struktur (Renault et al., 1998) eine Stabilisierung durch eine Reihe von Haupt- und Seitengruppen erwarten lassen. Im Komplex schiebt sich das beta-Faltblatt (wie eine Ramme) zwischen den P-Loop und Switch-II von Ran und interagiert mit Aminosäureresten des P-Loops und Helix alpha-3.

Die charakteristische C-terminale Schleife von Ran bindet in der GDP-Struktur mit dem sauren DEDDDL-Motiv an basische Regionen von Ran (139-142). Diese Interaktion stabilisiert den Ran-GDP Zustand und verhindert, daß die Effektorschleife (Switch-I) in die GTP-Konformation übergeht (Nilsson et al., 2002). In GppNHp (ein GTP-Analog) gebundenen Strukturen hat die C-terminale Schleife den Kontakt zu diesem Bereich gelöst. Biochemische Daten zeigen, daß diese Schleife die Wechselwirkung mit verschiedenen Interaktionspartnern wie beispielsweise Importin-beta und RanBP1 beeinflusst (Bischoff et al., 1995; Richards et al., 1995; Hieda et al., 1999; Villa et al., 2000). Insbesondere die Ran-GppNHp-RanBD1-Struktur (Vetter et al., 1999a) und der ko-stimulierende Einfluss von RanBD1 auf die GTP-Hydrolyse von Ran lassen vermuten das die C-terminale

Schleife eine Schalterfunktion bei dem Wechsel zwischen inaktivem Ran·GDP und aktivem Ran·GTP-Zustand übernimmt (Vetter et al., 1999a).

*In vivo* Experimente weisen darauf hin, daß dieser Effekt auch für die Ran-RCC1-Interaktion von Bedeutung ist. Es konnte hier gezeigt werden, daß eine C-terminal um sechs Aminosäuren verkürzte Ran-Mutante (d<sup>211</sup>DEDDDL) einen beschleunigten RCC1-katalysierten GDP-Austausch im Vergleich zu Ran-Wildtyp vorweist (Richards et al., 1996).

Die aus der Ran-RCC1-Struktur ableitbare freie Beweglichkeit dieses Bereichs veranschaulicht den obig dargestellten Befund, der C-terminale Rest von Ran wird hier für die Nukleotidfreisetzung aus der Ran·GDP-stabilisierenden Konformation gebracht. Zusammenhängend ist daher die Beweglichkeit dieser Region nicht nur als ein Nebeneffekt der Interaktion von Ran mit seinem Austauschfaktor zu sehen, sondern als notwendige Veränderung, die ausgehend vom proteingebundenen Zustand in der Ran·GDP-Form (Scheffzek et al., 1994) durch den Einfluss von RCC1 eingeleitet werden muss. Auf diese Weise wird wahrscheinlich die Switch-I-Region in ihrer Beweglichkeit nicht länger eingeschränkt und kann so die für die GTP- oder GDP-Bindung notwendige Konformation einnehmen. Hierdurch wird ein nicht präferentiell zugänglicher Zustand für die beiden Nukleotidformen erreicht. Dieser Befund wird durch Untersuchungen von Christian Klebe unterstützt, die zeigen, daß der RCC1-katalysierte Nukleotidaustausch an Ran keine Unterschiede bezüglich der Nukleotidform vorweist (Klebe et al., 1995a). Weder  $K_M$  noch  $k_{cat}$  zeigen signifikanten Unterschiede bei Verwendung von GDP oder GTP.

Ein weiterer wichtiger Befund war, daß der kristallisierte Ran-RCC1-Komplex zwar nukleotidfrei war, aber durch das Einbinden eines stabilisierenden Sulfats in der Nukleotidbindungstasche nicht den Endzustand einer abgeschlossenen Austauschreaktion zeigt. Die Situation entspricht mehr der eines katalytischen Übergangszustands. Eine vergleichbare Situation ist von der Kristallstruktur des Rac-Tiam-Komplexes (Worthylake et al., 2000) bekannt. In diesem Komplex ist ebenfalls ein Sulfat in der Position, die in der Nukleotid gebundenen Form von Rac das beta-Phosphat des Nukleotids einnimmt.

Die Gegebenheit, daß der Komplex aus Ran und RCC1 die Darstellung eines Reaktionsübergangszustands ist und keine abgeschlossene Reaktion zeigt, enthält Vorteile: Während die Konformation von Ran und RCC1 nach Nukleotidfreisetzung überwiegend ein Resultat aus der Bindung von GTPase und GEF wäre, dem der Einfluss von RCC1 auf den binären Komplex aus Ran und GDP deutlich schwerer zu entnehmen ist, können einem Reaktionsübergangszustand, bei dem sich ein Teil der Reaktion vollzogen hat, ein anderer jedoch noch nicht, für den Nukleotidaustausch wichtige Aminosäuren entnommen werden. Die anschließende Entwicklung eines Funktionsmodells ist so besser möglich und konnte hier erfolgen. Eine Röntgenkristallstruktur stellt jedoch immer nur eine Momentaufnahme dar und zeigt nicht mehrere Phasen einer Reaktion oder sogar ganze Reaktionsabläufe. Bei einer komplexen „multistep“ Reaktion, wie es der RCC1-katalysiert Nukleotidaustausch an

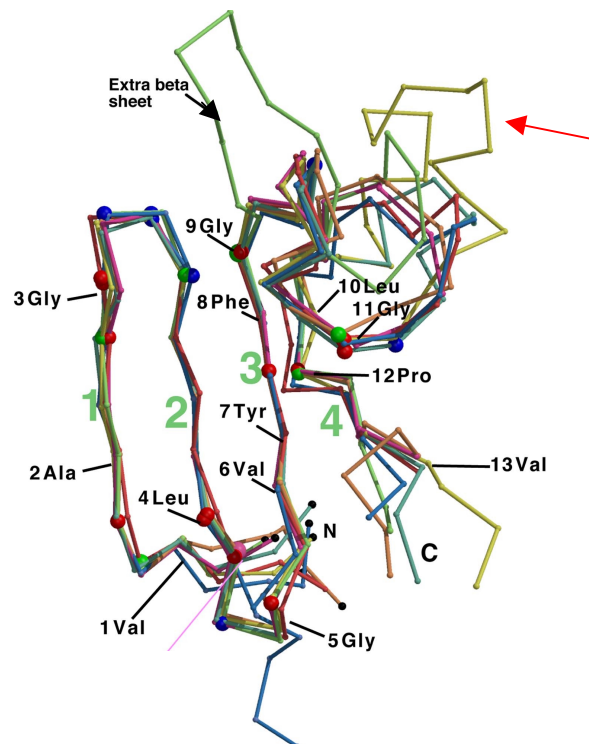
Ran ist, ist diese Tatsache besonders zu berücksichtigen. So konnten beispielsweise im guanosinbasenbindenden Bereich große konformationelle Änderungen festgestellt werden, deren Bedeutung für die Nukleotidfreisetzung nur durch indirekte Hinweise erfasst werden konnte. Der Einfluss des fehlenden Nukleotides war zu groß, als daß direkte Schlüsse gezogen werden konnten.

Der Phosphat bindende Bereich von Ran, der P-Loop, der normalerweise die Phosphate des Nukleotids umschließt (Saraste et al., 1990), ist trotz des fehlenden Nukleotides geometrisch intakt und ist prinzipiell für ein Nukleotid zugänglich. Aus Röntgenkristallstrukturen von EF-Ts·EF-Tu (Kawashima et al., 1996; Wang et al., 1997), Sos1-Ras (Boriack-Sjodin et al., 1998) und Sec7·Arf1 (Goldberg, 1998) geht hervor, daß das Fehlen des Nukleotids ein Kollabieren des P-Loop bewirkt und dadurch die Bindungsstelle für das Nukleotid nicht mehr zugänglich ist. Freies, nukleotid-ungebundenes Ran denaturiert nach relativ kurzer Zeit in diesem Zustand. Die durch die Präsenz des Sulfats stabilisierte Ran·RCC1-Struktur ermöglicht so einen Einblick in die intakte Nukleotidbindungstasche.

#### **4.1.1 Korrelation struktureller Veränderungen und Mutationsanalyse**

Unter der Zuhilfenahme verschiedener Ran- und RCC1-Strukturen, wie beispielsweise die Ran·GDP (Scheffzek et al., 1994), Ran·GppNHp RanBD1 (Vetter et al., 1999a), Ran·GppNHp·Importin-beta (Vetter et al., 1999b) oder RCC1 (Renault et al., 1998), war es möglich, aus strukturellen Veränderungen, die als Konsequenz der Komplexbildung zwischen Ran und RCC1 zu sehen sind ein Modell einer möglichen Austauschreaktion abzuleiten.

Signifikante Veränderungen finden ausschließlich auf der Seite von Ran statt. Die hiervon betroffenen Regionen belaufen sich auf Switch-I, Switch-II, alpha-Helix-3/4, die C-terminale Schleife und um das Basenbindungsmotiv NKxD<sub>122-125</sub>. Der Austauschfaktor erfährt selber nur verhältnismäßig wenig strukturelle Veränderung und initiiert die Nukleotidfreisetzung über vier seiner Strukturelemente. Zwei dieser Regionen treten hervor, da sie sich in den ansonsten sehr gleichförmig strukturierten RCC1-Blättern entweder in einem nicht der Konsensus-Struktur entsprechenden Element befinden oder von einem solchen Element umgeben sind. Zum einen ist dies das extra beta-Faltblatt, das als starres Gebilde aus RCC1 herausragt, zum anderen das G<sub>EQ</sub>Q<sub>X</sub>QLGR-Motiv<sub>199-206</sub>. Dieses Motiv wird durch Interaktionen innerhalb der Sequenz selbst sowie dem es umgebenden Bereichs wie der extra alpha-Helix<sub>219-224</sub> über Haupt- und Seitengruppen stabilisiert und stellt so ebenfalls einen starren, unflexiblen Bereich dar (s. Abbildung 55).



**Abbildung 55: Überlagerungsbild der sieben Blatt-Strukturen von RCC1.** Dargestellt sind strukturell konservierte Aminosäurereste. Mit Pfeilen markiert sind das extra beta-Faltblatt (schwarzer Pfeil) (Blatt 3) und die extra alpha-Helix (roter Pfeil) (Blatt 4).

Ein strukturell für den Nukleotidaustausch wichtiges Element ist der durch die RCC1 Propellerstruktur geformte Tunnel (s. Abbildung 14). Hier sind es das GGQ<sub>HF</sub>-Motiv<sub>407-410</sub> von Blatt 1 und die Aminosäure D128 von Blatt 2, die durch die Bindung und Fixierung von RanK99 eine für den Austausch wichtige Funktion übernehmen. Der dritte für die katalytische Aktivität notwendige Bereich ist das G<sub>X</sub>ND<sub>XX</sub>ALGR<sub>X</sub>T-Motiv<sub>92-113</sub> auf Blatt 2, daß durch mehrere Interaktion mit Ran zum einen die Bindung, zum anderen entscheidende konformationelle Änderungen unterstützt.

Aus der Strukturanalyse und den dort festgestellten strukturellen Veränderungen durch die Bildung des Ran-RCC1-Komplexes konnten letztlich auch für die Austauschreaktion relevante Aminosäuren abgeleitet werden. Um ihre Bedeutung für die Austauschreaktion im einzelnen zu analysieren wurden zunächst Punktmutationen oder Deletionen der in Frage kommenden Bereiche in die cDNA von Ran und RCC1 eingeführt. Nach Expression und Aufreinigung wurden auf Fluoreszenz-basierende Methoden sowie die Oberflächen Plasmon Resonanz (engl.: SPR) eingesetzt, um Interaktionsmessungen durchzuführen, die kinetische Informationen zu diesen Mutanten lieferten. Durch diese Daten konnte der katalytische Vorgang der RCC1-abhängigen Nukleotidfreisetzung an Ran größtenteils rekonstruiert werden. In der Literatur beschriebene Daten haben stützend und ergänzend dazu beigetragen, diesen Vorgang zu komplettieren.

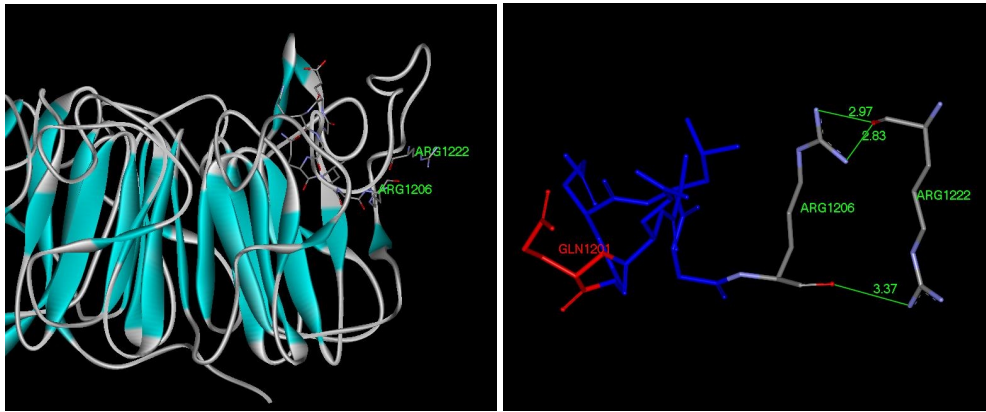
Das aus RCC1 weit herausragende extra beta Faltblatt gelangt durch die von 24 bzw. 25 Aminosäureresten unterstützte Bindung in Ran hinein. Es wird dabei zwischen

Switch-II und den P-Loop geschoben. Hier unterstützt es auf der einen Seite die Bindung an Ran über Kontakte mit dem Ran P-Loop und Ran alpha-Helix-3, während es auf der anderen Seite sterischen Druck mit dem äußersten Bereich des extra beta-Faltblatts ausübt und so über sein N149 das RanK71 verdrängt. Das Lysin 71 aus Ran befindet sich im Switch-II, der durch diesen Einfluss eine positionelle Veränderung durchläuft. Er wird aus dem nukleotidbindenden Bereich entfernt.

Eine RCC1d148d151-Mutante zeigt eine Verringerung der Affinität sowie eine starke Reduzierung der katalytischen Geschwindigkeit. Durch die hier vorgenommene Verkürzung des Faltblattbereichs können zum einen für die Bindung relevante Aminosäuren (147-150) die notwendige Position nicht einnehmen - hiervon betroffen ist vornehmlich die Bindung des P-Loop Bereichs - zum anderen ist die Reichweite des Faltblatts in Ran hinein deutlich geringer, so daß die Verdrängung von Switch-II nicht eingeleitet werden kann. RCC1N149A zeigte ebenfalls einen Effekt in  $k_{\text{cat}}$ , nicht aber in  $K_M$ . Diese Mutante kann wie Wildtyp die entsprechende Bindung zu Ran ausbilden, was sich im  $K_M$ -Wert widerspiegelt. Die Reduzierung von  $k_{\text{cat}}$  ist auf die verringerten sterischen Interaktionen mit RanK71 zurückzuführen und zeigt den katalytischen Einfluss dieser Aminosäure.

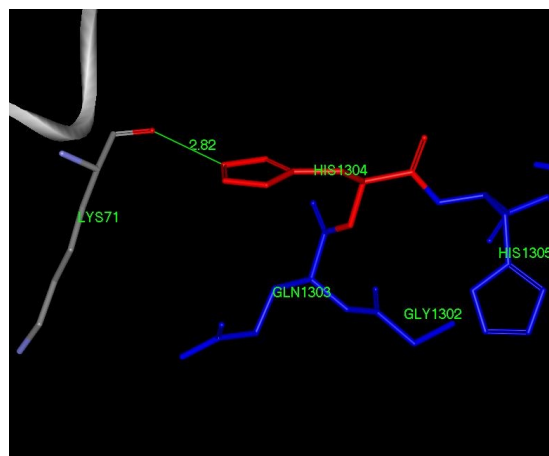
Die gezielte Verschiebung von Switch-II wird durch den Einfluss des RCC1  $G_{\text{EQ}}Q_xQLGR$ -Motiv<sub>199-206</sub> verstärkt. Das Glutamin 201 von RCC1 wird durch die Bindung beider Interaktionspartner in den Aktionsradius von RanF72 (Switch-II) gedrückt und erzwingt eine Umlagerung dieses Phenylalanins. Ein Ausweichen des Glutamins wird offensichtlich durch stabilisierende Wechselwirkungen mit den umliegenden Aminosäuren verhindert. Arginin 222 aus der unmittelbar dahinter liegenden extra-alpha-Helix bildet mit dem Arginin 206 über die Stickstoffatome der Aminosäurereste und die Sauerstoffatome des Rückgrats wichtige Wasserstoffbrücken aus, die eine Stabilisierung unterstützen.

Azuma konnte 1999 zeigen, daß eine RCC1R206A-Mutante die katalytische Geschwindigkeit von RCC1 um den Faktor 2,4 herabsetzt (Azuma et al., 1999). Hierbei zeigte der später aufgeklärte Ran-RCC1-Komplex, daß diese Aminosäure nicht direkt mit Ran interagiert, sondern stabilisierende Bindungen mit RCC1R222 aus der extra alpha-Helix<sub>219-224</sub> ausbildet (s. Abbildung 56) und nach aktueller Datenlage so die fehlende mittelbare Fixierung von Glutamin 201 zur Reduktion der katalytischen Wirkung führt. Weitere stabilisierende Wechselwirkungen liefern Q201-Q203, G202-G199, G197-L223 und P208-A212. Der katalytische Effekt des Glutamin 201 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Eine Alanin-Mutante bewirkte eine starke Reduzierung von  $k_{\text{cat}}$ , ohne die Affinität zu verringern.



**Abbildung 56:** Interaktion zwischen der extra  $\alpha$ -Helix<sub>219-224</sub> und dem  $G_{EQ}Q_XQLGR$ -Motiv<sub>199-206</sub>. RCC1R222 und RCC1R206 bilden Bindungen aus, die die Position des katalytisch wichtigen RCC1Q201 stabilisieren. Die Abbildung wurde mit dem WebLab-Viewer® erstellt.

RanK71 wird es durch diese Interaktion und den zusätzlichen Einfluss von RCC1N149 auf Switch-II ermöglicht, an RCC1H304 zu binden. So zeigt die Alanin-Mutante der RCC1 Aminosäure 304 in Interaktionsmessungen mit Ran eine starke Reduzierung in  $k_{cat}$  (9fach) und nicht in  $K_M$  (Azuma et al., 1996). Die Interaktion von Lys71 mit RCC1H304 hat demnach keinen Einfluss auf die eigentliche Bindung von Ran und RCC1. Sie ist Teil einer Umlagerungsreaktion, die nach der Assoziation stattfindet und der Freisetzung des Nukleotids dient.



**Abbildung 57:** Interaktion zwischen dem  $G_{QE}HH_{TS}$ -Motiv von RCC1 und RanK71. RCC1H304 (rot) aus dem  $G_{QE}HH_{TS}$ -Motiv<sub>302-306</sub> (blau) bindet im Ran-RCC1-Komplex RanK71 (mehrfarbig) und unterstützt so die Switch-II-Positionierung (grau). Die Abbildung wurde mit dem WebLab-Viewer® erstellt.

Zusätzlich werden durch die Wechselwirkung von RCC1Q201 und RanF72 und die daraus resultierende Neuorientierung von RanF72 Folgereaktionen ausgelöst, die eine Umlagerung innerhalb von Ran zur Folge haben. Die strukturelle Überlagerung von Ran-GDP und Ran-RCC1 zeigte, daß RanF72 in seiner neuen Position in die Umgebung von RanE70 hineinreicht. Als Folge durchläuft RanE70 ebenfalls eine Neuorientierung, in der es mit dem RanW104 zusammenstößt und diese Aminosäure in eine neue Position zwingt. Es kommt zu einer Drehung des RanW104 um 180°, die es näher zum P-Loop in



Richtung Nukleotidbindungsseite bzw. in Richtung extra beta-Faltblatt bringt. Wahrscheinlich ist auch, daß RanW104 die gezielte Verschiebung von Switch-II unterstützt, da alpha-Helix-3<sub>95-110</sub> von Ran durch die Interaktion mit RCC1 über RanK99 in Richtung E70 verschoben wird und so die Ausweichmöglichkeit von RanW104 gegenüber RanE70 limitiert sind.

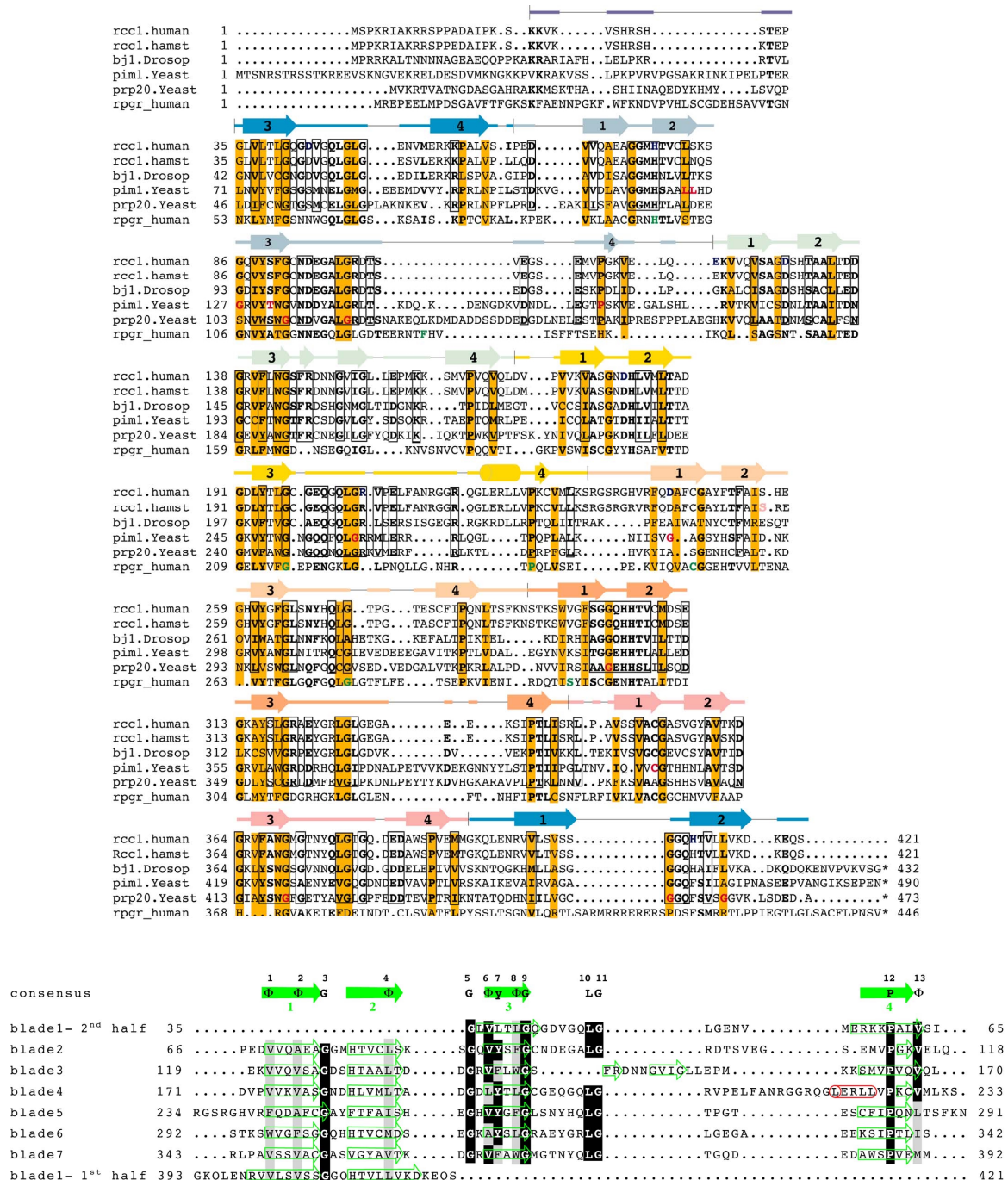
So konnte für die Alanin-Mutanten von RanE70 und RanF72 eine 31fach reduzierte RCC1-katalytische Nukleotidaustauschgeschwindigkeit gezeigt werden.

Der Einfluss der RanW104A-Mutante konnte in den kinetischen Analysen nicht gezeigt werden. Das Protein ließ sich zwar exprimieren, wie sich herausstellte war es jedoch nukleotidfrei. Die Tatsache, daß eine GTPase nicht mit Nukleotid beladen ist, weist erfahrungsgemäß auf einen starken Defekt der Nukleotidbindungsfähigkeit hin. Ob dies auch für die RanW104A-Mutante zutrifft, oder ob hier durch das eingeführte Alanin grundsätzliche Proteinfaltungsprobleme bestehen kann jedoch nicht genau gesagt werden. Der Einfluss dieser Aminosäure ist daher nur aus der Strukturanalyse und der mangelnden Fähigkeit der Nukleotidbindung geschlossen worden.

Ein weiterer für die Katalyse wichtiger Schritt ist die Interaktion zwischen dem von RCC1 gebildeten Tunnel und dem aus Ran herausgestreckten Lysin 99. Das Lysin 99 wurde zunächst als ein für die Bindung wichtiges Element in Betracht gezogen, da seine Distanz zum nukleotidbindenden Bereich zu groß ist, um einen direkten Einfluss auf die Freisetzung zu haben. Die kinetischen Daten zeigten jedoch, daß die Alaninmutante RanK99A im wesentlichen einen Effekt auf  $k_{\text{cat}}$  hat, während  $K_M$  nahezu unbeeinflusst bleibt. Das Lysin wird durch die Interaktion mit RCC1 um ca. 45° gedreht und die Ran alpha-Helix-3<sub>95-110</sub> leicht angehoben. Die Verschiebung von alpha-Helix-3 beeinflusst die Position von RanW104 und induziert so den beschriebenen Effekt auf Switch-II und den P-Loop von Ran.

Es erfolgt nicht nur eine einfache Verdrängung von RanK99 durch das GGMH-Motiv<sub>75-78</sub>, sondern eine genau definierte Positionierung von RanK99, durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit RCC1Q409 und RCC1D128. Sowohl das GGQ<sub>HF</sub>-Motiv<sub>407-410</sub> von Blatt 1 als auch die Aminosäure D128 von Blatt 2 befinden sich innerhalb des RCC1-Tunnels und sind evolutionär konservierte Aminosäuren (s. Abbildung 58). Eine strukturelle Konservierung dieser Aminosäuren, die der dreidimensionalen Ausbildung der Blattstruktur dient liegt innerhalb der sieben Blätter jedoch nicht vor. (s. Abbildung 58). Dies weist darauf hin, daß beide Aminosäuren für die eigentliche Blattstrukturbildung nicht notwendig sind und ihre Konservierung eher auf die Interaktion mit der GTPase zurückzuführen ist. Kinetische Untersuchungen konnten hier zeigen, daß eine RCC1D128A-Mutante spezifisch die katalytische Geschwindigkeit der Ran-RCC1-Interaktion um den Faktor 27 herabsetzt (Azuma et al., 1996). Eine signifikante Veränderung des  $K_M$ -Wertes konnte nicht festgestellt werden. Die unabhängig voneinander ermittelten Resultate von RanK99A und RCC1D128A weisen gemeinsam darauf hin, daß

die Interaktion von RanK99 mit RCC1D128 und RCC1Q409 nicht die eigentlichen Bindung von Ran und RCC1 unterstützt, sondern ein notwendiger Schritt für die Nukleotidfreisetzung ist.



**Abbildung 58: Konservierung innerhalb von RCC1.** oben) Primär- und Sekundär-Alignment von RCC1 verschiedener Organismen. Fünf RCC1-homologe Aminosäuresequenzen (Mensch, Hamster, Drosophila, Schizosaccharomyces pombe und Saccharomyces cerevisiae) wurden mit dem GCG-Programm auf Übereinstimmung untersucht. Über dem Alignment ist weiterhin die Sekundärstruktur des humanen Proteins dargestellt, wobei Pfeile beta-Faltblatt-Strukturen und Zylinder alpha-Helix-Strukturen darstellen. Bereiche konservierter Aminosäuren sind umrandet, invariante Aminosäuren sind fett und strukturell konservierte Bereiche sind braun unterlegt. unten) Überlagerungsbild der sieben Blatt-Strukturen von RCC1. Dargestellt sind strukturell konservierte Aminosäurereste (nummeriert von 1-13). Mit Pfeilen markiert sind das extra beta-Faltblatt (Blatt 3) und die extra alpha-Helix (Blatt 4).

Die Interaktion von RanK99 mit der Porenstruktur in RCC1 zeigt sich innerhalb der Gesamtstruktur als eine Art Verankerung von Ran in RCC1, vergleichbar der Fixierung des P-Loops und von alpha-Helix-3 über das RCC1 extra Faltblatt. Dort bietet die Bindung des P-Loops Halt, um Switch-II aus Ran zu verdrängen. Switch-II wird regelrecht aus der Struktur herausgedrückt. Im Fall der Bindung des RanK99 spielt neben der Positionierung der alpha-Helix-3 die Fixierung an RCC1 und dadurch die mögliche Bildung eines „Widerlagers“ eine wichtige Rolle. Durch die Initialbindung von RanK99 ist es möglich, die aus dem Base- und Ribose bindenden NK<sub>x</sub>D-Motiv kommende Schleife<sub>122-137</sub> über die RanK130·RCC1D95-Interaktion zu verdrängen und hierüber eine Verringerung der Nukleotidaffinität zu erreichen. Nachdem diese Schleife verdrängt ist und RCC1 sich ohne weitere sterische Störungen an Ran anlagern kann, bildet RCC1D95 Kontakte zwischen RanT93, RanS94 und RanR95 aus. Diese Bindungen verstärken die Affinität zwischen Ran und RCC1. Sowohl die RanK130A-Mutante als auch die Mutante im „Gegenrest“ RCC1D95A zeigten eine Reduzierung der katalytischen Geschwindigkeit (RanK130A 1,8fach; RCC1D95A 4090fach), wobei die relativ geringe Reduzierung der katalytischen Geschwindigkeit von RanK130A auf nur verringerte und nicht unterbundene sterische Störungen durch das Alanin zurückzuführen sind. Dies konnte aus der Überlagerung der Strukturdaten von Ran·RCC1 und Ran-GDP entnommen werden. RCC1D95A zeigte zudem noch eine 2,7fach verringerte Affinität zu Ran was ein Hinweis darauf ist, daß die Bindungen zwischen dem eingefügten Alanin und RanT93, RanS94 und RanR95 gestört sind. RanK130A bewirkte eine geringfügige Erhöhung der Affinität um den Faktor 1,8. Der Grund hierfür liegt in der besseren Zugänglichkeit von RCC1D95 für die Ran-Aminosäuren 93-95, durch die verringerten sterischen Störungen mit RanK130A. Eine Verkürzung der Ran-Schleife<sub>122-137</sub>, bei der die Interaktion von RCC1D95 und RanK130 nicht mehr möglich ist, sollte daher eine deutlich stärker erhöhte Affinität bei drastisch verringerter katalytischer Nukleotidaustauschgeschwindigkeit zeigen. Zudem sollte dann die Nukleotidbindungseigenschaft durch eine Verkürzung beispielsweise durch Deletion der Ran-Aminosäuren 128-132 nicht beeinflusst werden.

Für den Mechanismus des GEF-katalysierten Nukleotidaustausches wurde für das Ras-System eine Verschiebung der relativen Affinitäten innerhalb des ternären Komplex aus Ras, GDP und cdc25 angenommen (Lenzen et al., 1998). Der Austauschfaktor bindet zunächst „locker“ an die mit Nukleotid komplexierte GTPase. Nach einer konformationellen Umlagerung wechseln diese Zustände. Der Austauschfaktor hat nun eine höhere Affinität zu Ras, das Nukleotid eine verringerte. Hierdurch wird die Dissoziation des Nukleotids wahrscheinlicher.

Die Umkehrreaktion und die damit verbundene Umlagerung zwischen fest und locker gebundenem Zustand des Nukleotids verläuft möglicherweise auf dem gleichen Weg. Für Ran·RCC1 würde das Nukleotid dann zunächst in der Nukleotidbindungstasche über die Phosphate gebunden werden, bevor es wieder zur Bindung des NK<sub>x</sub>D-

Motives<sub>122-125</sub> kommt. Diese Bindung schränkt die Flexibilität der Schleife<sub>122-137</sub> ein und stört die RCC1D95 Bindungen. Schafft der flexible Bereich es, D95 wieder zu verdrängen und somit die Bindung zu RanT93, RanS94 und RanR95 zu lösen, verringert sich die Affinität von Ran und RCC1. Hierdurch findet eine Verlagerung der Affinitäten statt, die zur Dissoziation des Austauschfaktors führen kann.

Eine Initialbindung über die Phosphate des Nukleotids steht in Kontrast zu Überlegungen, die für die Ras-Sos-Interaktionen gemacht wurden. Hier wird vermutet, daß der Kontakt zwischen GNPB und Nukleotid über die Base und nicht über die Phosphate eingeleitet wird (Boriack-Sjodin et al., 1998; Wittinghofer, 1998). Die vorliegenden Daten weisen für den Ran-RCC1-Komplex jedoch auf die oben beschriebene umgekehrte Reihenfolge hin.

#### 4.1.2 Ein genereller Mechanismus

Im Gegensatz zu den strukturell stark verwandten Proteinen der Ras-Familie weisen ihre Austauschfaktoren keine einheitlichen Strukturmerkmale auf (Wittinghofer, 1999). Entsprechend sind auch Details der jeweiligen Austauschreaktion verschieden. Für die meisten der GEF-GNPB-Strukturen kann jedoch ein einheitliches Grundprinzip beschrieben werden. Der Austauschfaktor bringt Aminosäurereste in die Nähe des P-Loops und des  $Mg^{2+}$ -bindenden Bereichs und interagiert mit der Switch-I und II Region. Dadurch werden strukturelle Veränderungen bewirkt, die die Bindung der Phosphate und des Magnesiums beeinflussen. Der Ablauf dieses Vorgangs wurde als „push-and-pull“ Mechanismus beschrieben, in dem Switch-I aus seiner normalen Position herausgezogen wird und Switch-II gegen die Nukleotidbindungsseite gedrückt wird (Vetter und Wittinghofer, 2001).

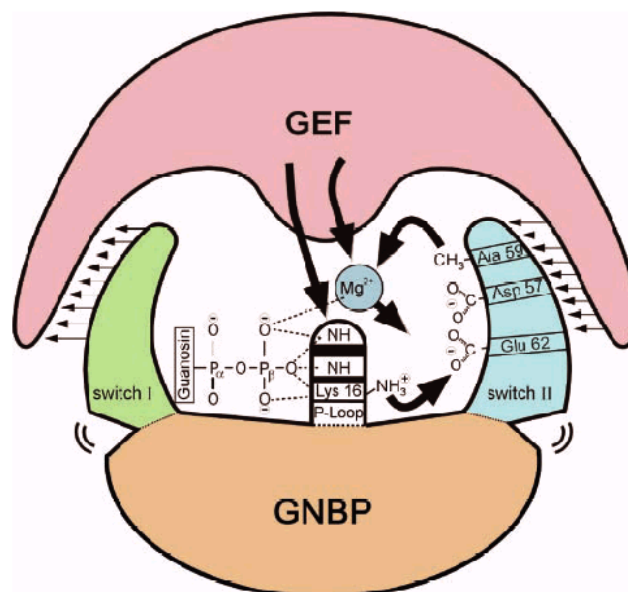


Abbildung 59: Dargestellt ist ein Modell (push-and-pull-Modell) in dem notwendige Einflüsse des GEFs auf GNPB für die Nukleotidfreisetzung gezeigt werden (Vetter und Wittinghofer, 2001)

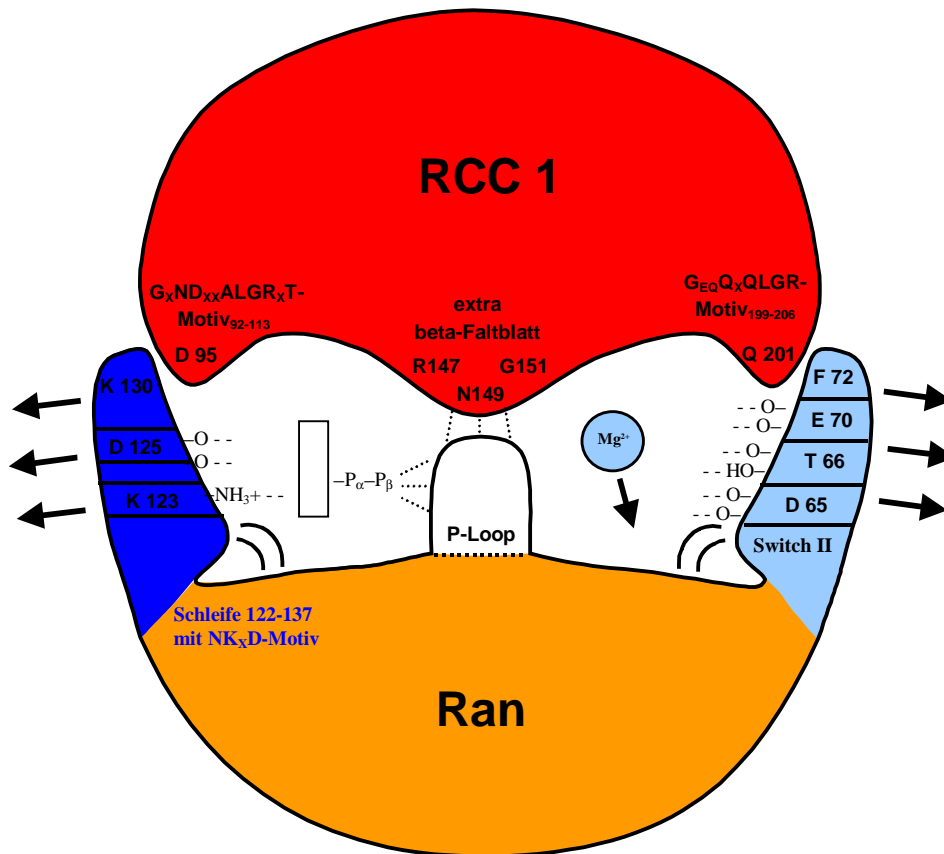
Die Strukturdaten des binären Komplexes aus Ran und RCC1 zeigen in ihrer Kombination mit den kinetischen Daten der verschiedenen Mutanten, daß RCC1 bei der Austauschreaktion diesem grundsätzlichen Prinzip folgt, der konkrete Ablauf jedoch in diversen Details modifiziert ist. Auch bei RCC1 werden zunächst entsprechende Aminosäuren in den P-Loop und  $Mg^{2+}$ -bindenden Bereich gebracht. Die Lösung der Interaktionen zum  $Mg^{2+}$ , das in der Ran-GDP-Form über Kontakte mit RanD65, RanT66 und RanE70 gebunden wird, erfolgt jedoch durch ein Drücken („push“) von Switch-II aus der Ran-Struktur heraus statt durch ein Hineindrücken/Schieben dieses Elements in die Ran-Struktur hinein. Obwohl  $Mg^{2+}$  zur festen Bindung des Nukleotids beiträgt (Klebe et al., 1995b), scheint es für die GEF-katalysierte Freisetzungsreaktion im allgemeinen eine eher untergeordnete Bedeutung zu haben. Dies zeigten kinetische Messungen in der Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  (Lenzen et al., 1998). Auch die in dieser Arbeit präsentierte nahezu unveränderte intrinsische Nukleotiddissoziationsrate der RanE70A-Mutante und Untersuchungen einer RasD57-Mutante (D65 in Ran) (John et al., 1993), die beide massgeblich in dem jeweiligen Protein an der  $Mg^{2+}$ -Fixierung beteiligt sind, zeigen lediglich eine siebenfach erhöhte Dissoziationsrate. Dies weist darauf hin, daß Switch-II nicht den wesentlichen Beitrag zur Nukleotidfreisetzung leistet.

Der P-Loop vermittelt einen wesentlichen Teil der Bindungsenergie für das Nukleotid in GxP bindenden Proteinen (John et al., 1990; Rensland et al., 1995; Muegge et al., 1996). Im Ran-RCC1-Komplex ist der P-Loop, vermutlich auch durch das eingelagerte stabilisierende Sulfat, selbst intakt, wird aber leicht zum extra beta-Faltblatt und gegen basenbindende Aminosäuren (RanD125, RanA151) gezogen. Auch wenn diese Veränderung nur gering ist und in einem möglichen nukleotidfreien Komplex stärkere Veränderungen zu erwarten sind, trägt sie möglicherweise einen Teil zur Freisetzung des Nukleotids bei.

Im Unterschied zu dem für viele GNBPs-GEF-Interaktion beschriebenen „push-and-pull“ Modell interagiert RCC1 nicht mit Switch-I in Ran. Demzufolge wird Switch-I auch nicht durch das GEF aus seiner Position herausgezogen. Stattdessen kommt es zu einem weiteren „push“, der sich auf die basenbindende Region auswirkt. Es ist die Verdrängung der sich aus dem NKxD-Motiv<sub>122-125</sub> fortsetzenden Schleife<sub>122-137</sub>. Sie wird über das RCC1 G<sub>X</sub>ND<sub>XX</sub>ALGR<sub>X</sub>T-Motiv<sub>92-113</sub> durch die Interaktion von RCC1D95 und RanK130 verschoben. Durch das Herausdrücken dieser Schleife aus der Ran-Struktur, werden stabilisierende hydrophobe Wechselwirkungen zu Ran gelöst. Als Folge besteht eine erhöhte Flexibilität der sich von Aminosäure 122 bis 137 erstreckenden Schleife, die in der Ran-RCC1-Struktur detektiert werden konnte. Diese Flexibilisierung wirkt sich wahrscheinlich auch auf die basenbindenden Aminosäuren RanK123 und RanD125 aus, wodurch sie immer wieder aus ihrer exakten Position gegenüber der Base gebracht werden, die Bindungsstärke reduziert sich und die Affinität von Ran gegenüber dem Nukleotid wird reduziert.

Aus den beschriebenen Zusammenhängen ergibt sich für Ran und RCC1 ein Modell, das sich in den konkreten Abläufen von anderen GEF·GNBP-Austauschreaktionen unterscheidet. Das grundsätzliche Prinzip ist jedoch sehr ähnlich.

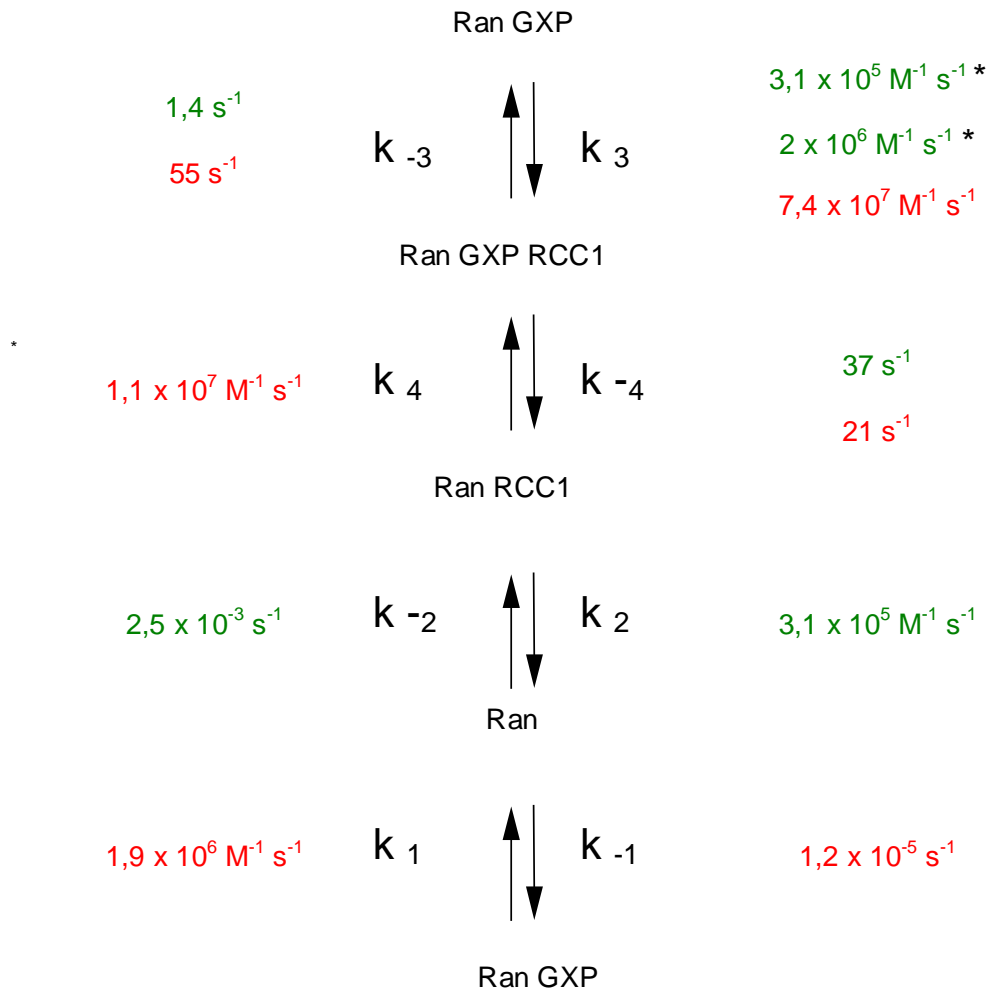
Durch das Fixieren von Ran über mindestens zwei Positionen (P-Loop und Lys99) wird das Verdrängen von zwei wichtigen Bereichen (Switch-II und Schleife<sub>122-137</sub>) bewirkt, wodurch die Affinität des Nukleotids herabgesetzt wird.



**Abbildung 60:** Dargestellt ist ein Modell (umbrella-like-push-Modell) in dem die notwendigen Einflüsse von RCC1 an Ran gezeigt werden, die für die Nukleotidfreisetzung notwendig sind. Dieses Modell unterscheidet sich von dem in Abbildung 59 dargestellten "push-and-pull-Modell" durch die verdrängten Bereiche und durch die Verdrängungsrichtung.

### 4.1.3 Ergänzende Daten zur Ran·RCC1-Interaktion

Die in dieser Arbeit ermittelten Assoziations- und Dissoziationskonstanten lieferten Ergänzungen zu den bereits publizierten kinetischen Modellen für die RCC1-katalysierte Austauschreaktion (Klebe et al., 1995a; Klebe et al., 1995b).



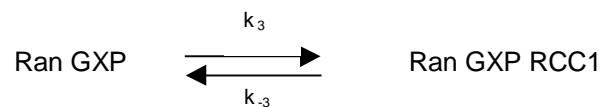
**Abbildung 61: Assoziations- und Dissoziationskonstanten der einzelnen in die Nukleotidfreisetzung involvierten Reaktionsschritte .** Ergänzung mit Daten aus der Literatur (rot) (Klebe et al., 1995a). Die Messungen wurden bei 25°C in KPi-Puffer pH 7,4 durchgeführt. Die aus dieser Arbeit stammenden Daten (grün) wurden bei 20°C in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5 ermittelt (\* durch SPR (oben) und durch Stopped-Flow ermittelte Daten).

In den vorausgegangenen Arbeiten konnten aufgrund der verwendeten Techniken einige Parameter nur indirekt ermittelt werden. Daher wurden nun zwei experimentelle Ansätze gewählt, die eine direkte Detektion der Assoziation von Ran und RCC1 zuließen. Zum einen ermöglichte eine mit 1,5 IAEDANS markierte RanC112S/V47C-Mutante die Verfolgung der durch die RCC1-Bindung bewirkten Fluoreszenz-veränderung im Stopped-Flow. Zum anderen konnte die Assoziation durch die Verwendung der Oberflächen-



Plasmon-Resonanz-Technik (SPR) verfolgt werden. Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik basiert auf der Registrierung einer Veränderung der optischen Dichte, die sich durch die Bindung oder Dissoziation eines freien Liganden an seinen in einer Matrix gebundenen Reaktionspartner verändert.

Für die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von RCC1 an den Ran·GDP-Komplex wurde die Bindung von RCC1 an GST-Ran-GDP verfolgt. Die hieraus abgeleitete Konstante entspricht dann  $k_3$  des Minimalmodells (s. Abbildung 26).



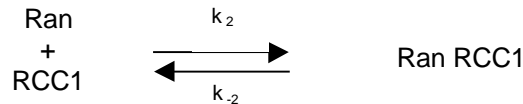
Gleichung 33

Aus dem Reaktionsablauf des RCC1-katalysierten Nukleotidaustausch an Ran·GDP ist zu entnehmen, daß es nach der Bindung von RCC1 zwei Wege für den Zerfall des gebildeten Ran·GDP RCC1-Komplexes zur Verfügung stehen. Zum einen kann es zur Freisetzung des Nukleotids kommen, zum anderen der Austauschfaktor selbst wieder abdissoziieren. Mit der Freisetzung von Nukleotid besteht dann aber auch die Möglichkeit bereits ausgebildete Ran·RCC1-Komplexe wieder zu dissoziieren.

Ein Vergleich der Assoziationsgeschwindigkeit diese Experiments mit der Assoziationsgeschwindigkeit einer Messungen bei der nukleotidfreies GST-Ran verwendet wurde, zeigte ein vergleichbares Resultat (unveröffentlichte Daten von Dr. Jürgen Kuhlmann). Die oben beschriebene Problematik, die durch freies Nukleotid erzeugt wird, besteht in diesem Ansatz nicht. Das Experiment zeigt daher eine vom Nukleotid unbeeinflusste Bindung von RCC1 an GST-Ran. Die Interpretation dieses Vergleichs lässt zwei mögliche Aussagen zu. Entweder ist der Einfluss des Nukleotids im ersten Ansatz größer als erwartet und die vergleichbaren Assoziationsgeschwindigkeiten der beiden Versuchsansätze mit und ohne GDP sind zufällig. Oder, was wahrscheinlicher ist, der Einfluss durch die Rückbindung des Nukleotids an GST-Ran oder RCC1 gebundenes GST-Ran ist verhältnismäßig gering und die beiden experimentellen Ansätze weisen darauf hin, daß RCC1 mit gleicher Geschwindigkeit an Ran, wie an Ran-GDP bindet. Die Assoziationsgeschwindigkeit ist demnach unabhängig vom Nukleotid. Aus dieser Annahme würde sich ergeben, daß die Unterschiede der Gleichgewichtskonstanten  $K_2$  und  $K_3$  unmittelbar von den jeweiligen Dissoziationskonstanten ( $k_{-2}$  und  $k_{-3}$ ) abhängen. Die Betrachtung der von Klebe und Mitarbeitern experimentell ermittelten Daten ließ erkennen, daß die Annahme gleicher Assoziationskonstanten für die RCC1-Bindung an Ran und an Ran-GDP nicht im Widerspruch zu den von Klebe ermittelten Daten steht (Klebe et al., 1995). Ein direkter Vergleich der einzelnen Parameter war jedoch aufgrund unterschiedlicher Messtemperatur und einer unterschiedlich zusammengesetzten Puffer-



substanz, die durch die Verwendung des SPR-Gerätes vorgegeben waren nur bedingt möglich. Der Vergleich der Assoziationsgeschwindigkeit des auf SPR basierenden Experiments mit der Assoziationsgeschwindigkeit, die aus der Verfolgung des RanC112S/V47C-1,5-IAEDANS Signals hervorging, zeigte eine Differenz um den Faktor 6,5 (SPR  $k_3 = 3,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Fluoreszenz  $k_3 = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).



Gleichung 34

Durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $k_{-2}$ ) konnte gezeigt werden, daß sich  $k_{-2}$  und  $k_3$  um einen Faktor 400 voneinander unterscheiden. Durch die anschließende Kalkulation von  $K_2$  wird ersichtlich, daß nicht nur die Anwesenheit von RCC1 die Affinität des Nukleotids herunter setzt, wie Klebe zeigen konnte, sondern das die Anwesenheit des Nukleotids auch die Affinität des Austauschfaktors herunter setzt, was dem reversiblen Austauschmodell entspricht. Die Entscheidung zwischen der Bildung des Komplex aus Ran·GDP und Ran·RCC1 wird lediglich durch eine 2,5fach höhere Affinität des Ran·GDP-Komplexes beeinflusst. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß aufgrund der Konzentrationen an Ran, Nukleotid und RCC1 innerhalb des Zellkerns beide binären Komplexe zu finden sind.

Die Ermittelten Daten aus den Stopped-Flow- und den SPR-Messungen (BIAcore) sind in Abbildung 61 in das kinetische Modell des RCC1-katalysierten Nukleotidaustausches an Ran eingebracht worden. So konnten die fehlenden Parameter ergänzt werden und die kinetische Beschreibung der einzelnen Teilschritte erfolgen.

Ein Vergleich mit den von Klebe ermittelten Daten, zeigt zum Teil starke Abweichungen. Eine Ursache dieser Diskrepanzen ist vermutlich die unterschiedliche Zusammensetzung der Puffersubstanzen. In seiner Dissertation konnte Klebe beispielsweise die Veränderung der intrinsischen Nukleotiddissoziationsrate an Ran in Abhängigkeit von unterschiedlichen Puffersubstanzen um den Faktor 3,4 beobachten. Ebenfalls konnte Klebe Unterschiede bei der Verwendung verschiedener (fluoreszenz-markierter) Nukleotide feststellen. Die oben abgebildeten kinetischen Daten von Klebe wurden mit 2'-desoxy,3'-Methylantraniloyl-GDP ermittelt, wahren in dieser Arbeit mit dem 2'-, bzw. 3'-Methylantraniloyl-GDP-Isomerengemisch gearbeitet wurde oder mit unmarkiertem Nukleotid. Der große Unterschied in  $k_3$  (Faktor 240) kann jedoch nicht allein auf diese Weise begründet werde. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_3$ ,  $k_2$  und  $k_{-3}$  wurden mit Hilfe der SPR-Methode durchgeführt. Bei dieser Methode ist während der Messung einer der Bindungspartner fest an eine Matrix gebunden und liegt so nicht frei beweglich in Lösung vor. Diese Bindung

scheint einen drastischen Einfluss auf  $k_{on}$  und  $k_{off}$  zu haben. So zeigten Lars Nieba und Mitarbeiter in vergleichenden Messungen mit Antikörpern und Peptiden, daß Unterschiede sowohl in  $k_{on}$  als auch in  $k_{off}$  bis zu einem Faktor von 500 zwischen sich in Lösung befindlichen und gebundenen (SPR-Methode) Interaktionspartnern festzustellen sind (Nieba et al., 1995). Ebenfalls wies eine persönliche Mitteilung von Frau Dr. Astrid U. Krämer darauf hin, daß vergleichbare Differenzen auch für Interaktionen von Ras mit verschiedenen Bindungspartnern detektiert wurden. Offensichtlich hat die Reduzierung der freien Beweglichkeit einen großen Einfluss auf die Interaktion zweier Bindungspartner. Zahlreiche Untersuchungen, die gezeigt haben, daß RCC1 DNA assoziiert ist (Kalab et al., 2002; Nemergut et al., 2001), lassen darauf schließen, daß die Fixierung eines Bindungspartners, wie es im SPR-System der Fall ist, durchaus eine realistische, zelluläre Situation darstellt. Welches Messsystem letztlich die realistischere, zelluläre Situation widerspiegelt, kann hier nur vermutet werden. Die in der Stopped-Flow-Apparatur mit RanC112S/V47C-1,5-IAEDANS erhaltenen Daten liegen deutlich näher an den durch die SPR-Methode ermittelten Daten (Faktor 6,5 zu den SPR-Daten, Faktor 32 zu Klebes Daten) und geben Anlass zur Vermutung, daß sich die Geschwindigkeitskonstante von Ran-GDP und RCC1 in dem Bereich der hier ermittelten Daten liegt.

#### **4.1.4 Regulation und Stabilität des Ran-GTP-Gradienten**

Viele Komponenten des nukleo-zytoplasmatischen Transports sind beschrieben und in ihrer Interaktion mit den unterschiedlichen Elementen des nukleo-zytoplasmatischen Transportsystems z. T. gut charakterisiert (Ran, Importin-alpha, Importin-beta, RanGEF, RanGAP, NTF2, BP1,-2). Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, daß mit Hilfe dieser kleinen GTPase und ihren regulatorischen Proteinen ein Gradient zwischen Kern und Zytoplasma aufgebaut werden kann, der das nukleo-zytoplasmatische Transportsystem antreibt (Kalab et al., 2002). Das Verhalten einzelner Proteine dieses Transportsystems im komplexen Zellsystem und die Art der Regulation sind dagegen schwer zugänglich und daher nur karg untersucht.

Der Aufbau eines Ran-GTP-Gradienten wird durch den RCC1-katalysierten Nukleotidaustausch im Nukleus gespeist. Wir waren, über die unmittelbare Bedeutung einzelner Seitengruppen für die Interaktion der beiden beteiligten Proteinen hinaus, daran interessiert, inwieweit ausgewählte Mutationen die Stabilität des Gradienten und damit die Gesamtleistung des nuklearen Imports beeinflussen würden.

Mit Hilfe eines auf permeabilisierten Zellen basierenden Versuchsaufbaus wurde die durch das Kerntransportsystem vermittelte Importgeschwindigkeit der Importin-beta-Bindungsdomäne untersucht. Durch die Verwendung verschiedener Ran Mutanten konnte gezeigt werden, daß eine Regulation über das gradientenbildende System möglich ist.

Die durch das Kerntransportsystem ermittelte Importgeschwindigkeit (s. Abbildung 47) wurde durch die Ran-Mutanten in unterschiedlich starker Abstufung beeinflusst.

Hieraus leitet sich ein Regulationsmechanismus ab, der auf der Basis des gradientbildenden Systems den Import durch Variation der Transportgeschwindigkeit und somit der absoluten Transportereignisse kontrolliert.

Neben Proteinen, die dem Erhalt des Gradienten dienen, existieren auch regulatorische Faktoren, die dazu beitragen, einen sinnvollen Ablauf unterschiedlicher Transportereignisse zu koordinieren.

Unter den für das Transportsystem relevanten Komponenten sind einige bekannt, die Einfluss auf den Wechsel des Ran-GTP oder Ran-GDP-gebundenen Zustand haben. Hierunter fallen z. B. die RanBP (Ran Bindenden Proteine). RanBP1 bindet fest an Ran-GTP ( $K_D$  ca. 1 nM) (Kuhmann et al., 1997) und führt zu einer Co-Stimulation der RanGAP-katalysierten GTP-Hydrolyserate von Ran (Bischoff et al., 1995; Richards et al., 1995). Ihre Affinität zu Ran-GDP ist vergleichsweise gering und liegt bei ca. 10  $\mu$ M. Mog1 besitzt GEF-Aktivität und ist überwiegend kernlokalisiert. Es arbeitet aufgrund seiner erhöhten Affinität zu Ran-GTP vergleichsweise zu Ran-GDP in die entgegengesetzte Richtung von RCC1 (Steggerda und Paschal, 2000). Eine Erhöhung der Mog1-Konzentration im Kern, würde die Ran-GTP-Konzentration reduzieren und somit ggf. die Transportgeschwindigkeit beeinflussen.

#### **4.1.4.1 Regulation über die Ran-RCC1-Interaktion**

In dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von verschiedenen Ran-Mutanten untersucht. Diese Ran-Mutanten wurden ebenfalls hinsichtlich der Interaktion mit ihrem Nukleotidaustauschfaktor RCC1 betrachtet (s. Tabelle 5), wodurch die jeweiligen kinetischen Parameter bekannt waren. Durch die Kombination von kinetischer Analyse und *in vivo* ermittelter Importgeschwindigkeit eines nicht mit Ran in direkten Kontakt tretenden Transportadapters (IBB) wurde erstmals ein direkter Vergleich dieser Parameter durchgeführt und diskutiert. Es war so möglich, die Abhängigkeit des nukleo-zytoplasmatischen Transportsystems von der Ran-RCC1-Interaktion zu betrachten.

Aus der Interaktionsanalyse zwischen Ran-GDP und RCC1 hervorgegangenen Ran-Mutanten, mit unterschiedlich stark beeinflusster katalytischer Geschwindigkeit (s. Tabelle 5) (RanV45I, 74%; E70A, 3%; K99A, 10%; W104; K130A, 56%) wurden im „Import-Assay“ eingesetzt und die Transportgeschwindigkeit anhand der Fluoreszenz verfolgt. Ein Vergleich der relativen Daten ermöglichte die Abschätzung einer Abhängigkeit des nukleo-zytoplasmatischen Transports von der RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran (s. Abbildung 51).

Hier wurde deutlich, daß dieses Transportsystem aus der Sicht der Ran-RCC1-Interaktion sehr robust aber dennoch regulierbar war, da es eine Reduzierung der maximal beobachteten Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran um das 10fache (90%) toleriert, ohne die Transportgeschwindigkeit heruntersetzen zu müssen. Möglicherweise bewirkt erst eine Reduzierung der maximal beobachteten Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran

um das 33fache (97%) eine Reduzierung der Importgeschwindigkeit. Kalkulationen an einem Computermode (Schaff et al., 2000) stützen diese Erkenntnis. Hier konnte gezeigt werden, daß erst eine Reduzierung der RCC1-Konzentration um das 100fache (99%) die steady-state Importgeschwindigkeit herun (Smith et al., 2002).

Weitere kinetische Untersuchungen der im Kerntransportassay eingesetzten Mutanten mit den Interaktionspartnern Importin-beta und RanBP1 konnten für einen Vergleich herangezogen werden. Hier stellte sich heraus, daß das Transportsystem nicht nur von seiten der Ran-RCC1-Interaktion ein sehr robustes, störunanfälliges System ist. Es ist ebenfalls in der Lage, eine Reduzierung der Affinität von Ran zu Importin-beta um das 33fache (97%), in Kombination mit einer 10fach reduzierten RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran zu tolerieren, ohne daß eine Reduzierung der Importgeschwindigkeit die Konsequenz ist. Mit Hilfe der Affinitäten der Ran-Mutanten zu Importin-beta und RanBP1 konnte auch die Frage beantwortet werden, ob für die Reduzierung der Importgeschwindigkeit bei RanV45I die Interaktion mit Importin-beta oder RanBP1 verantwortlich sein kann. In beiden Fällen, - sowohl für Importin-beta als auch für RanBP1 - kann durch die starke Reduzierung der Affinität, die aus den vorliegenden Daten hervorgeht, die verringerte Importgeschwindigkeit begründet werden und möglicherweise eine Erklärung für den durch diese Ran-Mutante im Hefehomolog erzeugten Phänotyp sein (Fleig et al., 2000). Bei RanV45I ist es genau wie bei den Mutanten RanE70A und RanK130A jedoch nicht auszuschließen, daß die detektierte Reduzierung der Importgeschwindigkeit auf Interaktionsstörungen mit weiteren, nicht untersuchten Interaktionspartnern zurückzuführen ist. Diese Vermutung liegt besonders für RanK130A nahe. Sie zeigt eine 8fach reduzierte Affinität zu Importin-beta, während RanK99A eine 33fache Reduzierung zeigt, die sich nicht auf die Importgeschwindigkeit auswirkt. Gleiches gilt für die RCC1-katalysierte Nukleotidaustauschgeschwindigkeit, die bei RanK99A deutlich stärker reduziert ist und so nicht der Grund für die Reduzierung bei RanK130A sein kann. Als mögliche Ursache für die verringerte Importgeschwindigkeit im Kernimportassay bei dem Zusatz von RanK130A kommt die verringerte Affinität zu RanBP1 in Frage. Sie ist um den Faktor 2 reduziert. Hier gegen sprechen allerdings die theoretischen Kalkulationen von Smith und Mitarbeitern (Smith et al., 2002). Demnach wirkt sich erst eine 10fache (90%) Reduzierung der RanBP1-Konzentration auf den Import aus. Ob eine Regulation über die Ran-RCC1-, Ran-Importin-beta- oder Ran-RanBP1-Interaktion wirklich stattfindet, kann hier nicht gesagt werden.

Es konnte zwar durch NTF2, der Importfaktor von Ran, eine natürlich vorkommende Inhibition der RCC1-katalysierten GDP-Dissoziation von Ran gezeigt werden (Yamada et al., 1998), ob diese Inhibition ein für die Zelle relevanter Regulationsmechanismus ist, ist jedoch fraglich. Die aus diesen Untersuchungen und den von Smith gemachten Kalkulationen hervorgegangenen Ergebnisse lassen eher allgemein vermuten, daß die notwendige Reduzierung der Austauschrate zu groß ist, als das hierüber eine feine

sinnvolle Regulation durchgeführt wird. Da aber mit permeabilisierten Zellen und nicht mit sich im normalen Stoffwechsel befindlichen Zellen gearbeitet wurde, ist eine Abschätzung der Auslastung des Ran-Systems, zum Beispiel durch den Grundbedarf an Transportereignissen oder über die Einbindung in das mikrotubuläre Netzwerk (Kalab et al., 1999; Fleig et al., 2000; Hetzer et al., 2000; Dasso et al., 2001), nicht abzuschätzen. Möglicherweise ist in intakten Zellen eine weitaus geringere Reduzierung der Ran-RCC1-Interaktion notwendig, um eine Verlangsamung des Imports zu erreichen, so daß der Einfluß der oben beschriebenen Faktoren ggf. doch wesentlich mehr von Bedeutung ist als zunächst vermutet und diese eine Funktion der Regulation des Ran-GTP-Gradienten übernehmen.

#### **4.1.5 Regulationsmöglichkeit über posttranslationale-Modifikation der NLS**

Die Regulation des Transportsystems über die direkt mit Ran interagierenden Proteine kann lediglich die Reduzierung oder Vermehrung der Transportereignisse insgesamt bewirken. Das komplexe Zusammenspiel von Katabolismus, Anabolismus und die Reaktion auf Umwelteinflüsse über Signaltransduktion (Reizweiterleitung) erfordert eine Differenzierung unterschiedlicher Transportsignale. Eine selektive Regulierung ermöglicht den Ablauf eines kontrollierten Transports zwischen Kern und Zytoplasma und unterstützt somit den koordinierten Ablauf der oben genannten Vorgänge.

Posttranslationale Modifikation als regulatorisches Element ist allgemein akzeptiert. Beispielsweise wird die Lokalisation der kleinen GTPase Ras durch Modifikationen am C-Terminus beeinflusst (Bader et al., 2000). Rezeptoraktivitäten werden größtenteils durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. So ist beispielsweise die Aktivierung des Estrogen-Rezeptors sehr eingehend untersucht. Wird dieser Rezeptor durch die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) phosphoryliert, verstärkt sich die hormonvermittelte Aktivierung (Kato et al., 1995).

Posttranslationale Modifikation im NLS (Nuclear Location Sequence) Bereich wird als mögliche Regulation des Kerntransports schon seit längerem in Betracht gezogen und untersucht (Rihs et al., 1991; Jans et al., 1991). Es liegen Untersuchungen vor, die beschreiben, daß über Phosphorylierung regulierte NLS (prNLS) durch hormonale Stimulation, die Phase des Zellzyklus oder gewebspezifische Bedingungen beeinflusst werden (Forwood et al., 2002; Lam et al., 1999; Cai und Linsenmayer, 2001; Nachury et al., 1998).

Die Etablierung eines Zellassays, mit dessen Hilfe es möglich ist, den NLS-vermittelten Import am Peptidmodell zu untersuchen, ist ein hilfreiches Werkzeug, um einen detaillierteren Einblick in den Mechanismus der Regulation des Imports zu erhalten. Weiterführend ist der peptidgekoppelte Import verschiedener Substanzen wie beispielsweise größere Proteine oder Medikamente ein vielversprechendes Werkzeug.

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden drei Modifikationszustände einer fluoreszenzmarkierten Kernlokalisationssequenz aus v-Jun (Tagawa et al., 1995) verwendet: der phosphorylierte, der glykosylierte und der unmodifizierte Zustand. Sie wurden unabhängig voneinander in Säugerzellen injiziert und die Akkumulation im Kern betrachtet. Dabei konnten Hinweise erhalten werden, daß eine Glykosylierung eines unmittelbar vor der NLS liegendes Serins die Akkumulation im Kern nicht merklich verändert, die Phosphorylierung dieses Serins diese aber stark reduziert. Es konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob es sich bei dem durch Phosphorylierung bewirkten Effekt um verringerten Import handelt oder um eine Affinitätsreduzierung des Peptids zu den Bindungsstellen innerhalb des Kerns. Aus früheren Untersuchungen konnte entnommen werden, daß sich die Phosphorylierung des tumorrelevanten Transkriptionsfaktors v (viral)-Jun negativ auf die Importaktivität auswirkt (Tagawa et al., 1995), was den Einfluss auf die Importaktivität zeigt und so vermuten läßt, daß die gemachten Beobachtungen ein Resultat des Importverhaltens sind.

Generell können die Auswirkungen der Phosphorylierung NLS enthaltener Proteine jedoch gegensätzlich sein. Phosphorylierungsstellen beispielsweise von CKII und cdk (Cyclin dependent Kinase) cdc2, die sich in der Nähe der (T-ag) NLS befinden, übernehmen eine physiologisch wichtige Rolle für die Lokalisation. Wird CKII-S<sup>112</sup> phosphoryliert, führt dies zu einem verstärkten Import von CKII. Die Inhibition der Phosphorylation oder das Deletieren des Serins bewirkt eine Verlangsamung des Imports (Rihs et al., 1991; Jans et al., 1991; Jans 1995; Rihs et al., 1989). Im Gegensatz hierzu steht eine umgekehrte Regulation des Imports von cdc2. Durch Phosphorylierung des Thr124 wird die Importaktivität dieses Proteins stark reduziert (Jans et al., 1991).

Mit Hilfe des Peptidmodells konnten so ergänzende Hinweise auf eine durch Modifikation eingeführte selektive Differenzierbarkeit des nukleo-zytoplasmatischen Transportsystems erhalten werden, die eine Unterscheidung verschiedener Zielproteine erlaubt. Die durch Modifikation erreichte Differenzierbarkeit ist hier nicht auf konformationelle Veränderungen des NLS-tragenden Proteins zurückzuführen, wie bei NFAT (nuclear factor of activated T-cells), sondern auf die Affinität der NLS zum Transportfaktor oder dem im Kern gebundenen Bereich. Im Fall von NFAT erzeugt die Dephosphorylierung durch Calcineurin eine konformationelle Veränderung, die ein Herausstellen der NLS bewirkt. Hierdurch wird der Import aktiviert (Beals et al., 1997). Die Rephosphorylierung von NFAT innerhalb des Kerns, z. B. durch Proteinkinase A, im Gegenzug unterstützt den Export (Beals et al., 1997).

Auf diesem Weg und in Verbindung mit anderen Regulationselementen wie Promotoren, Repressoren, verschiedenen Transkriptionsfaktoren oder der Regulation auf Translationsebene wird so eine immer genauere Abstimmung der Zellregulation möglich.

Das Peptidmodell zeigt sich als prinzipiell verwendbares System, an das jedoch im folgenden Proteine oder andere große Moleküle gekoppelt werden müssen, die eine diffusionsbedingte Akkumulation im Kern unterbinden.

#### **4.1.6 MPS-NLS-vermittelter Import**

Effizienter Transport von Medikamenten in Zellen hinein und danach in deren Kern spielt für die Medikamentenherstellung eine wichtige Rolle. Ein Problem stellt beispielsweise die Degradation der Wirkstoffe und deren Trägermaterial dar, was zur Folge hat, daß höhere Wirkstoffkonzentrationen eingesetzt werden müssen und so eine größere Belastung für den Organismus besteht. Hilfreiche Methoden für den Zugang in die Zelle sind Mikroinjektion, Liposomenfusion oder Elektroporation. Sie sind jedoch nicht für eine große Anzahl von Zellen und besonders nicht für den Einsatz in Organismen geeignet.

Seit vielen Jahren liegt die Erkenntnis vor, daß der signalvermittelte Kernimport durch eine NLS bewirkt wird. Dieser fünf bis ca. 20 Aminosäuren langer Bereich enthält meist basische Aminosäuren (Adam 1994, Görlich et al., 1994). Proteine, die eine solche Sequenz enthalten, werden aktiv über das nukleo-zytoplasmatische-Transportsystem in den Kern transportiert. Weiterhin wurden Sequenzen entdeckt, die in der Lage sind, über die Zytoplasmamembran in die Zelle zu gelangen. Sie werden als MPS (membrane penetrating sequence) bezeichnet. Für diese MPS wurden verschiedene Experimente beschrieben, bei denen ein Transport in die Zelle erreicht wurde (Derossi et al., 1994; Brugidou et al., 1995). Durch die Kombination dieser zwei Sequenzen wurden Peptidmodelle entwickelt, die zum einen eine MPS vermittelte Membranintegration zeigen, zum anderen den darauffolgenden NLS-vermittelten Kernimport (Chaloin et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde das Importverhalten eines Peptids betrachtet, das aus einer myristoylierten MPS des HIV-1 Matrixproteins gag MA (Van Etten et al., 1989) und einer NLS des Maus Proteins c-Abl (Wen et al., 1996) bestand, die durch einen vier Aminosäuren langen Verbrückungssequenz (Linker) verbunden wurden. Das Matrixprotein gag MA ist ein lipidiertes (Myristoyl-Rest) membranassoziiertes Protein, von dem beschrieben wurde, daß seine Membranassoziation reversibel ist und so eine Dissoziation aus der Zellmembran möglich ist (Burkinsky et al., 1993; Burkinskaya et al., 1996). Die MPS dieses Proteins sollte die Membraneinlagerung bewirken, durch einen Flip-Flop-Effekt auf die zytoplasmatische Seite der Zellen gelangen und dort eine Dissoziation ins Zytoplasma ermöglichen.

Die durchgeführten Untersuchungen, bei denen vor Fixierung und mikroskopischer Betrachtung die Peptide in das Medium der wachsenden Zellen gegeben wurden, zeigten, daß das Peptid nur in sehr wenigen Fällen im Kern lokalisiert war. Der größte Teil der Resultate bei 10 min Behandlung war eine verhältnismäßig gleichförmige Verteilung der Fluoreszenz mit Aussparung des Zellkerns (s. Abbildung 54). Über Nacht inkubierte

Zellen zeigten Aggregate, die sich um die Kernhülle herum bildeten und weitere, die der Struktur des Golgiapparates ähnlich sind.

Das konstruierte Peptid konnte sich in die Membran einlagern und dadurch in die Zelle gelangen, es wurde aber nicht verstärkt im Kern akkumuliert. Entgegen den Erwartungen war der Bereich des Zellkerns weniger stark mit Fluoreszenz versehen als das Zytoplasma. Da das Peptid aufgrund seiner geringen Größe nicht daran gehindert wird, in den Kern zu gelangen, kann bei einer diffusionsunterstützten Verteilung davon ausgegangen werden, daß bei nicht aktivem Transport in den Kern eine gleichmäßige Verteilung sowohl im Zytoplasma als auch im Kern zu finden ist. Dies konnte für Peptide gezeigt werden, die aus einer hydrophoben Sequenz von GP41 und der Kernlokalisierungssequenz des SV40-Antigen-T bestanden (Chaloin et al., 1998). Chaloin und Mitarbeiter konstruierten verschiedene Peptide, die von der GP41-MPS und der SV40-Antigen-T-NLS abgeleitet wurden. Mutationen in einigen Bereichen der Sequenz führten zur Unterbindung des aktiven Transports und zeigten eine gleichmäßige Verteilung über den ganzen Zellbereich.

Die Verteilung des Peptids aus der gag MA-MPS und der c-Abl-NLS lässt vermuten, daß sich das Peptid nicht aus der Membran herausgelöst und dort über die Zeit Aggregate gebildet hat, die so einige Membranbereiche stark angefärbt haben. Resultate aus Messungen mit hoher Peptidkonzentration haben gezeigt, daß die Zytoplasmamembran zerstört wird. Es ist vorstellbar, daß durch eine verstärkte Peptideinlagerung die Membran durchlöchert wird und so zu dem erhaltenen Resultat geführt hat. Hohe Peptidkonzentrationen können toxisch für Zellen sein und deren Nekrose bewirken (Bonnet et al., 2001). Möglicherweise haben die basischen Lysine der NLS die Membranbindung unterstützt. Murray konnte zeigen, daß Myristoylreste in Kombination mit einem basischen Bereich, der sich an die negativ geladenen Phospholipide lagert, die Reversibilität der Membraneinlagerung unterbunden wird (Murray et al., 1998). Die Membranaffinität wird hierdurch um das 3000fache erhöht (Resh 1999). Im membrangebundenen Zustand wäre zusätzlich durch eine Anlagerung der NLS an die Lipiddoppelschicht die Bindung eines nukleozytoplasmatischen Transportfaktors nicht möglich. Die Bindung ist zum einen für den Kernimport notwendig, zum anderen würde sie ein Herauslösen des Peptids aus der Membran unterstützen, da eine Wiederanlagerung der basischen Sequenz an die Phospholipide verhindert wird. Da eine zugängliche NLS für die Bindung des Transportfaktors und den damit verbundenen Kernimport notwendig ist, konnte im Fall von NFAT (nuclear factor of activated T-cells) gezeigt werden. Konformationelle Veränderungen des Proteins bewirken ein Herausstellen der NLS und ermöglichen so die Bindung des Transportfaktors und den Kernimport (Beals et al., 1997). Die Resultate der Experimente und die ergänzenden Informationen aus in der Literatur beschriebenen Experimenten lassen darauf schließen, daß sich das Peptid irreversibel in die Membran eingelagert hat und dadurch nicht weiter in den Kern transportiert werden konnte.



Insgesamt kann daher gesagt werden, daß der Versuchsaufbau geeignet und daher prinzipiell als Testsystem für derartige Versuche einsetzbar ist, die verwendete Sequenz aus gag MA/c-Abl jedoch nicht in der eingesetzten Form für den MPS-NLS vermittelten Peptid-Import verwendet werden kann. Möglicherweise reichen hier jedoch auch kleine Modifikationen innerhalb der Sequenz wie im Fall der MPS-NLS-Sequenz aus GP41 und SV40-Antigen-T aus, um einen erfolgreichen Kernimport zu erreichen (Chaloin et al., 1998).

## 4.2 Ausblick

Für eine detailliertere Untersuchung des RCC1-katalysierten Nukleotidaustausches an Ran wären Strukturen des ternären Komplexes aus Ran, Nukleotid und RCC1 mit vergleichbarer Auflösung um 1,7 Å sowohl im GDP- als auch im GTP-beladenen Zustand von Interesse. Ebenso könnten aus einer nukleotidfreien Struktur, die weder das Nukleotid noch ein Polyanion in der Nukleotidbindungstasche enthält, nützliche Details erhalten werden. Zum einen lässt sich der nukleotidfreien Struktur die Konformation der abgeschlossenen Austauschreaktion entnehmen und der Zustand des P-Loops bezüglich der Stabilität vergleichend mit anderen GNBPs-GEF-Komplexen beschreiben. Zum anderen erschwert das Fehlen der nukleotidgebundenen Struktur die Klärung der Frage um die Reihenfolge der Veränderung im NKxD-Motiv<sub>122-125</sub> und so die Frage, ob die Veränderungen im NKxD-Motiv<sub>122-125</sub> die Nukleotidfreisetzung maßgeblich bewirken oder lediglich eine Konsequenz des Basenverlustes sind. Die Ergänzung all dieser strukturellen Informationen würde detailliertere Vergleiche mit den Strukturen anderer GNBPs-GEF-Komplexe erlauben und könnte dazu beitragen, die Unterschiede im Mechanismus und Gemeinsamkeiten im Prinzip der Nukleotidfreisetzung zu verstehen. Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Ansätzen zur Kristallisation des ternären Komplexes ist die Optimierung durch Verwendung anderer Ran-Konstrukte naheliegend. Ein Konstrukt mit einer Deletion innerhalb der Ran-Schleife um RanK130 herum würde aus struktureller Sicht und aus den ermittelten kinetischen Daten der Mutationsanalyse die RanK130-RCC1D95-Interaktion unterbinden und einen stabilen Komplex aus Ran, Nukleotid und RCC1 bilden. Dieses Konstrukt könnte es ermöglichen, eine erfolgreiche Kristallisation des ternären Komplexes durchzuführen.

Für die Beschreibung der kinetischen Parameter der einzelnen Schritte bei der Austauschreaktion ist es von Interesse, vorhandene Daten durch weitere Messungen zu ergänzen und besonders die Diskrepanzen, die sich zwischen den von Klebe berechneten Daten aus dem simultanen Fit (Klebe et al., 1995a) und den in dieser Arbeit ermittelten SPR- (GST-Ran) und Stopped-Flow (RanC112S/V47C-1,5-IAEDANS)-Daten in Bezug auf die Assoziation von RCC1 und Ran-GDP zeigten, zu untersuchen und so eine Begründung für diese Unterschiede bzw. die tatsächliche Geschwindigkeitskonstante der Assoziation zu finden. SPR-Messungen mit einem GST-RCC1-Konstrukt und freiem

Ran·GDP oder ein anderes IAEDANS markiertes Ran Cystein-Konstrukt sollten dazu beitragen, diesen Schritt besser zu charakterisieren.

Die *in vivo*-Experimente in HeLa-Zellen haben nicht dazu geführt, eine deutliche Grenze der minimal für den Import notwendigen Ran·RCC1-, Ran·RanBP1- und Ran·Importin-beta-Aktivität zu ermitteln. Der Einfluss dieser Interaktionen auf die Stabilität des nukleo-zytoplasmatischen Transports ist für das Verständnis dieses Mechanismus und die Bedeutung für die Zelle beispielsweise in Form möglicher Regulationswege von Bedeutung. In diesem Zusammenhang sind ebenfalls die kritischen Konzentrationen (reduzierte Importgeschwindigkeiten) mit den übrigen für den Transport relevanten Faktoren (RanGAP, NTF2, bzw. Proteine aus dem Kernporenkomplex) notwendig, um die Zusammenhänge genauer zu verstehen.

Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung posttranslationaler Modifikation (Bsp. Phosphorylierung und Glykosylierung) im NLS-Bereich sollen in einem Folgeprojekt durchgeführt werden. Die Lösung der Probleme, die durch das Ausbleichen der Fluoreszenz und das diffusionsbedingte Eindringen der NLS-Peptide in den Kern entstanden sind, sollen innerhalb eines Kooperationsprojektes mit Stefanie Schlummer (MPI-Dortmund) behoben werden. Die Kopplung eines fluoreszenzmarkierten Proteins soll zum einen durch Verwendung eines anderen Fluorophors ein schnelles Ausbleichen der injizierten Proben durch den Laser verhindern, zum anderen soll aufgrund der aus der Kopplung resultierenden Größe des Konstruktes eine diffusionsbedingte Akkumulation im Kern verhindert werden. Mit diesem Versuchsaufbau sollte daher die auf die jeweilige Modifikation der NLS zurückzuführende Veränderung am aktiven Import untersucht werden können. Zudem soll die Frage geklärt werden, inwieweit die genannten Modifikationen im NLS-Bereich Einfluss auf die Affinität zwischen NLS und NLS-bindendem Protein (Importin-alpha) haben. Hierfür eignet sich ein experimenteller Ansatz, bei dem durch Fluoreszenzpolarisation über Anisotropie des fluoreszenzmarkierten NLS-Peptids in Ab- und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Importin-alpha die Affinität beider Moleküle zueinander ermittelt wird.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der RCC1-katalysierte Nukleotidaustausch an Ran durch eine strukturelle Charakterisierung des Ran·RCC1-Proteinkomplexes analysiert und die mögliche Bedeutung dieser Austauschreaktion für die Regulation des nukleo-zytoplasmatischen Transports betrachtet.

Die Röntgenkristallstruktur dieser Interaktionspartner zeigt einen Übergangszustand, der durch ein Sulfat im beta-Phosphatbindungsbereich stabilisiert wird. Aus der Anordnung beider Proteine zueinander konnte die zuvor postulierte Bindungsorientierung betätigt werden. Zudem stützt die durch die Komplexbildung bewirkte Flexibilität des C-terminalen Bereiches den biochemischen Befund, daß der basische C-Terminus die RCC1-katalysierte Nukleotidfreisetzung verlangsamt.

RCC1 steht im Gegensatz zu anderen GEF·GNBP-Interaktionen nicht mit Switch-I in Kontakt und weist so auf einen andersartigen Austauschmechanismus an Ran hin. Mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Messmethoden konnten aus der Strukturanalyse hervorgegangene Mutanten auf ihre kinetischen Parameter untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß der in die Magnesiumbindung involvierte Switch-II einen wichtigen Angriffspunkt für die Nukleotidfreisetzung darstellt. Ferner werden durch das strukturell markante extra beta-Faltblatt, das auch bei dem Switch-II „Angriff“ beteiligt ist, Aminosäurereste des Austauschfaktors in die Nähe des P-Loops gebracht, gebunden und Ran hierdurch fixiert. Beides entspricht einem häufig von GEF-Proteinen genutzten Prinzip. Ein bestehender Unterschied zu dem generalisierten Prinzip ging schon aus der fehlenden Interaktion von RCC1 mit Switch-I hervor. Interaktionen mit Switch-I werden von Nukleotidaustauschfaktoren genutzt, um konformationale Veränderungen im nukleotidbindenden Bereich zu bewirken, wodurch die Nukleotidaffinität herabgesetzt wird. Dies ist bei RCC1 nicht der Fall. Hier konnte gezeigt werden, daß RCC1 für weitere konformationale Veränderungen seinen Einfluss auf die Ran-Schleife zwischen dem beta-Faltblatt-5 und der alpha-Helix-3 nutzt. Diese aus dem NKxD-Motiv<sub>122-125</sub> kommende Ran-Schleife von der Aminosäure 122 bis 137 wird durch die Interaktion zwischen RCC1D95 und RanK130 aus seiner für nukleotidgebundenen Ran charakteristischen Position gebracht. Durch eine Alanin-Mutante der RCC1-Aminosäure D95 konnte eine Reduzierung der maximalen Austauschgeschwindigkeit um das 4000fache erreicht werden.

In Verbindung mit dieser Interaktion konnte eine Wirkungsweise von RanK99 ermittelt werden. Die aus Ran hervorstehende Aminosäure hat trotz ihrer großen Entfernung zum nukleotidbindenden Bereich einen starken Effekt auf die maximale Austauschgeschwindigkeit. Sie wird durch Bindung der Interaktionspartner in den charakteristischen Tunnel der RCC1-Struktur gebracht. Dort wird sie durch Wasserstoffbrückenbindungen fixiert und stellt für die Verdrängung der Schleife<sub>122-137</sub> eine Art „Widerlager“ dar. Aufgrund der vorliegenden Datenlage konnte ein Modell entwickelt

werden, das sich von dem gängigen Modell der GEF-katalysierten Nukleotidaustauschreaktion an GNB in der Vorgehensweise und den interagierenden Bereichen unterscheidet. Das Prinzip der Nukleotidfreisetzung ist allerdings mit dem allgemeinen GEF-GNB-Interaktionsmodell vergleichbar.

Durch kinetische Interaktionsanalysen mit Ran und RCC1 konnten fehlende bzw. aus einem simultanen Fit berechnete Daten zu dem von Klebe (Klebe et al., 1995a) erstellten RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschmodell ergänzt werden. Der Vergleich von aus dem simultanen Fit errechneter und in dieser Arbeit über SPR (GST-Ran) und Stopped-Flow (RanC112S/V47C-1,5-IAEDANS) ermittelter Assoziationsgeschwindigkeit von RCC1 an den nukleotidgebundenen Zustand von Ran zeigte Abweichungen um den Faktor 31 bzw. 240.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß das für die Zelle wichtige nukleo-zytoplasmatische Transportsystem ein sehr robustes, störunanfälliges und regulierbares System ist. Ein Ran-GTP-Gradient zwischen Zytoplasma und Zellkern ist die treibende Kraft dieses Transportsystems und der RCC1-katalysierte Nukleotidaustausch an Ran ist u. a. essentiell für die Bildung und Erhaltung dieses Gradienten. Durch *in vivo*-Messungen konnte gezeigt werden, daß eine stufenweise Herabsetzung der Importgeschwindigkeit möglich ist und daher das Transportsystem nicht nach dem „alles-oder-nichts-Prinzip“ arbeitet. Hieraus erwächst die Möglichkeit einer über das gradientenbildende System laufenden Regulation der Importprozesse. Die erhaltenen Resultate ließen in Bezug auf die Ran-RCC1-Interaktion und die Ran-Importin-beta-Interaktion auf eine enorm hohe Stabilität des Transportsystems schließen. Es konnte hier gezeigt werden, daß das Transportsystem eine Reduzierung von  $k_{cat}$  der RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeit um den Faktor zehn (90%), in Kombination mit einer Reduzierung der Ran-Importin-beta-Affinität um den Faktor 33 (97 %) toleriert, ohne daß die Transportgeschwindigkeit beeinflusst wird. Hinweise deuten darauf, daß erst die 33fache (97 %ige) Reduzierung von  $k_{cat}$  der RCC1-katalysierten Nukleotidaustauschgeschwindigkeit an Ran den Transport einschränkt.

Durch Entwicklung eines auf Mikroinjektion basierenden Importassays, mit dem der NLS-vermittelte Kerntransport am Peptidmodell untersucht werden kann, wurde die Grundlage für ein hilfreiches Werkzeug erhalten, mit dem der Einfluss posttranslationaler Modifikation an Kernlokalisationssequenzen (NLS) simuliert werden kann. Resultate vorläufiger Untersuchungen zeigen das unterschiedliche Verhalten hinsichtlich der Akkumulation im Kern von phosphorylierter-, glykosylierter- und nicht modifizierter v-Jun-Kernlokalisationssequenz. Die Etablierung dieses Versuchsaufbaus gilt als Basis für weiterführende detaillierte Untersuchungen, die der Regulation des nukleo-zytoplasmatischen Transports dienen.

Zur Fragestellung des MPS (membrane penetrating sequence) NLS (nuclear localization sequence) vermittelten Imports konnte gezeigt werden, daß ein Peptid,

bestehend aus einer myristoylierten Sequenz des HIV-1-Matrixproteins gag MA (MPS) und der NLS des Maus-Proteins c-Abl, zwar in der Lage ist, sich in die Zellmembran einzulagern und so in die Zelle zu gelangen, wahrscheinlich aufgrund zu starker Membranaffinität aber nicht in den Kern der Zelle gelangt. Auf der Grundlage der durchgeführten Experimente kann daher gesagt werden, daß sich dieses Konstrukt nicht als Transportersystem eignet, um mögliche Kopplungsprodukte vom extraplastischen Raum durch die Zellmembran in den Zellkern zu transportieren.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, E.J. and Adam, S.A. (1994). Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J Cell Biol JID - 0375356 125*, 547-555.
- Adam, S.A., Marr, R.S., and Gerace, L. (1990). Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol JID - 0375356 111*, 807-816.
- Adam, S.A. and Gerace, L. (1991). Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell JID - 0413066 66*, 837-847.
- Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E., and Goldberg, M.W. (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci JID - 0052457 113 ( Pt 10)*, 1651-1659.
- Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A., and Ringe, D. (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature JID - 0410462 372*, 704-708.
- Azuma, Y., Seino, H., Seki, T., Uzawa, S., Klebe, C., Ohba, T., Wittinghofer, A., Hayashi, N., and Nishimoto, T. (1996). CONSERVED HISTIDINE RESIDUES OF RCC1 ARE ESSENTIAL FOR NUCLEOTIDE EXCHANGE ON RAN. *Journal of Biochemistry 120*, 82-91.
- Azuma, Y., Renault, L., Garcia-Ranea, J.A., Valencia, A., Nishimoto, T., and Wittinghofer, A. (1999). Model of the Ran-RCC1 interaction using biochemical and docking experiments. *Journal of Molecular Biology 289*, 1119-1130.
- Bader, B., Kuhn, K., Owen, D.J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., and Kuhlmann, J. (2000). Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction. *Nature JID - 0410462 403*, 223-226.
- Bayliss, R., Littlewood, T., Strawn, L.A., Went, S.R., and Stewart, M. (2002). GLFG and FxFG Nucleoporins bind to overlapping sites on Importin-beta. *J Biol Chem JID - 2985121R EDAT- 2002/10/10 04:00 MHDA- 2002/10/10 04:00 PHST- 2002/Oct/07 [aheadofprint] AID - 10.1074/jbc.M209037200 [doi] AID - M209037200 [pii] PST - aheadofprint*
- Beals, C.R., Clipstone, N.A., Ho, S.N., and Crabtree, G.R. (1997). Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev JID - 8711660 11*, 824-834.
- Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., and Crabtree, G.R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science JID - 0404511 275*, 1930-1934.
- Becker, J., Melchior, F., Gerke, V., Bischoff, F.R., Ponstingl, H., and Wittinghofer, A. (1995). RNA1 encodes a GTPase-activating protein specific for Gsp1p, the

- Ran/TC4 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* JID - 2985121R 270, 11860-11865.
- Behrens, P., Brinkmann, U., Fogt, F., Wernert, N., and Wellmann, A. (2001). Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development. *Anticancer Res* JID - 8102988 21, 2413-2417.
- Beinhauer, J.D., Hagan, I.M., Hegemann, J.H., and Fleig, U. (1997). Mal3, the Fission Yeast Homologue of the Human APC-interacting Protein EB-1 Is Required for Microtubule Integrity and the Maintenance of Cell Form. *J.Cell Biol.* 139, 717-728.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O., Schirmer, N.K., Sprinzl, M., and Hilgenfeld, R. (1993). Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* JID - 0410462 365, 126-132.
- Bischoff, F.R. and Ponstingl, H. (1991). Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10830-10834.
- Bischoff, F.R. and Ponstingl, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 354, 80-82.
- Bischoff, F.R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A., and Ponstingl, H. (1994). RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 2587-2591.
- Bischoff, F.R., Krebber, H., Kempf, T., Hermes, I., and Ponstingl, H. (1995). HUMAN RANGTPASE-ACTIVATING PROTEIN RANGAP1 IS A HOMOLOGUE OF YEAST RNA1P INVOLVED IN MRNA PROCESSING AND TRANSPORT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1749-1753.
- Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., and Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J* JID - 8208664 14, 705-715.
- Blobel, G. and Wozniak, R.W. (2000). Proteomics for the pore. *Nature* 403, 835-836.
- Boman, A.L., Delannoy, M.R., and Wilson, K.L. (1992). GTP hydrolysis is required for vesicle fusion during nuclear envelope assembly in vitro. *J Cell Biol* JID - 0375356 116, 281-294.
- Bonnet, D., Thiam, K., Loing, E., Melnyk, O., and Gras-Masse, H. (2001). Synthesis by chemoselective ligation and biological evaluation of novel cell-permeable PKC-zeta pseudosubstrate lipopeptides. *Journal of Medicinal Chemistry* 44, 468-471.
- Boriacksjodin, P.A., Margarit, S.M., Barsagi, D., and Kuriyan, J. (1998). THE STRUCTURAL BASIS OF THE ACTIVATION OF RAS BY SOS. *Nature* 394, 337-343.
- Bos, J.L. (1997). Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta* JID - 0217513 1333, M19-M31

- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* JID - 0410462 348, 125-132.
- Boutin, J.A. (1997). Myristoylation. *Cell Signal* JID - 8904683 9, 15-35.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brugidou, J., Legrand, C., Mery, J., and Rabie, A. (1995). The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system. *Biochem Biophys Res Commun* JID - 0372516 214, 685-693.
- Bukrinskaya, A.G., Ghorpade, A., Heinzinger, N.K., Smithgall, T.E., Lewis, R.E., and Stevenson, M. (1996). Phosphorylation-dependent human immunodeficiency virus type 1 infection and nuclear targeting of viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* JID - 7505876 93, 367-371.
- Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., and Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* JID - 0410462 365, 666-669.
- Cai, C.X. and Linsenmayer, T.F. (2001). Nuclear translocation of ferritin in corneal epithelial cells. *J Cell Sci* 114, 2327-2334.
- Carazo-Salas, R.E., Guarguaglini, G., Gruss, O.J., Segref, A., Karsenti, E., and Mattaj, I.W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* JID - 0410462 400, 178-181.
- Chaiken, I., Rose, S., and Karlsson, R. (1992) Analysis of macromolecular interactions using immobilized ligands. *Analytical Biochemistry* 201, 197-210.
- Chaloin, L., Vidal, P., Lory, P., Mery, J., Lautredou, N., Divita, G., and Heitz, F. (1998). Design of carrier peptide-oligonucleotide conjugates with rapid membrane translocation and nuclear localization properties. *Biochem Biophys Res Commun* JID - 0372516 243, 601-608.
- Chi, N.C., Adam, E.J., and Adam, S.A. (1995). Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. *J Cell Biol* JID - 0375356 130, 265-274.
- Chi, N.C., Adam, E.J., Visser, G.D., and Adam, S.A. (1996). RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. *J Cell Biol* JID - 0375356 135, 559-569.
- Chook, Y.M. and Blobel, G. (1999). Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp [see comments]. *Nature* 399, 230-237.
- Colbeau, A., Nachbaur, J., and Vignais, P.M. (1971). Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim Biophys Acta* JID - 0217513 249, 462-492.



- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1994). Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* JID - 0404511 265, 1405-1412.
- Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K. und Newhouse, Y. (1994) Screening and Optimization Strategies for Macromolecular Crystal-Growth. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 50, 414-4123.
- Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A., and Moore, P.B. (1994). The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J* JID - 8208664 13, 3661-3668.
- Daniel, R., Chung, S.W., Eisenstein, T.K., Sultzer, B.M., and Wong, P.M. (2001). Specific association of Type I c-Abl with Ran GTPase in lipopolysaccharide-mediated differentiation. *Oncogene* JID - 8711562 20, 2618-2625.
- Dasso, M. (2001). Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell* JID - 0413066 104, 321-324.
- Dasso, M. (2001). Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell* JID - 0413066 104, 321-324.
- de Boer, H.A., Comstock, L.J., and Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* JID - 7505876 80, 21-25.
- Denning, D., Mykytka, B., Allen, N.P., Huang, L., Al, B., and Rexach, M. (2001). The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p-GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex. *J Cell Biol* JID - 0375356 154, 937-950.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* JID - 2985121R 269, 10444-10450.
- Dilworth, D.J., Suprpto, A., Padovan, J.C., Chait, B.T., Wozniak, R.W., Rout, M.P., and Aitchison, J.D. (2001). Nup2p dynamically associates with the distal regions of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* JID - 0375356 153, 1465-1478.
- Dingwall, C., Sharnick, S.V., and Laskey, R.A. (1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* JID - 0413066 30, 449-458.
- Doye, V. and Hurt, E. (1997). From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* JID - 8913428 9, 401-411.
- Dreusicke, D. and Schulz, G.E. (1986). The glycine-rich loop of adenylate kinase forms a giant anion hole. *FEBS Lett* JID - 0155157 208, 301-304.
- Drivas, G.T., Shih, A., Coutavas, E., Rush, M.G., and D'Eustachio, P. (1990). Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol Cell Biol* JID - 8109087 10, 1793-1798.

- Englmeier, L., Olivo, J.C., and Mattaj, I.W. (1999). Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol JID* - 9107782 9, 30-41.
- Fabre, E. and Hurt, E. (1997). Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annu Rev Genet JID* - 0117605 31, 277-313.
- Fahrenkrog, B., Stoffler, D., and Aeby, U. (1992). Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol JID* - 0110513 259, 95-117.
- Fleig, U., Salus, S.S., Karig, I., and Sazer, S. (2000). The fission yeast Ran GTPase is required for microtubule integrity. *Journal of Cell Biology* 151, 1101-1111.
- Fontoura, B.M., Blobel, G., and Matunis, M.J. (1999). A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J Cell Biol JID* - 0375356 144, 1097-1112.
- Forwood, J.K. and Jans, D.A. (2002). Nuclear import pathway of the telomere elongation suppressor TRF1: Inhibition by importin alpha. *Biochemistry* 41, 9333-9340.
- Galy, V., Olivo-Marin, J.C., Scherthan, H., Doye, V., Rascalou, N., and Nehrbass, U. (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* 403, 108-112.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Goldberg, J. (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell JID* - 0413066 95, 237-248.
- Goldberg, M.W. and Allen, T.D. (1995). Structural and functional organization of the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol JID* - 8913428 7, 301-309.
- Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A., and Hartmann, E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 79, 767-778.
- Gorlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E., and Prehn, S. (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol JID* - 9107782 5, 383-392.
- Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aeby, U., and Bischoff, F.R. (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO Journal* 15, 5584-5594.
- Greasley, S.E., Jhoti, H., Teahan, C., Solari, R., Fensome, A., Thomas, G.M., Cockcroft, S., and Bax, B. (1995). The structure of rat ADP-ribosylation factor-1 (ARF-1) complexed to GDP determined from two different crystal forms. *Nat Struct Biol JID* - 9421566 2, 797-806.
- Hartwell, L.H. (1967). Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J Bacteriol JID* - 2985120R 93, 1662-1670.

- Hetzer, M., Bilbao-Cortes, D., Walther, T.C., Gruss, O.J., and Mattaj, I.W. (2000). GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. *Mol Cell JID* - 9802571 5, 1013-1024.
- Hetzer, M., Meyer, H.H., Walther, T.C., Bilbao-Cortes, D., Warren, G., and Mattaj, I.W. (2001). Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol JID* - 100890575 3, 1086-1091.
- Hetzer, M., Gruss, O.J., and Mattaj, I.W. (2002). The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly. *Nat Cell Biol JID* - 100890575 4, E177-E184
- Hieda, M., Tachibana, T., Yokoya, F., Kose, S., Imamoto, N., and Yoneda, Y. (1999). A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J Cell Biol JID* - 0375356 144, 645-655.
- Hirshberg, M., Stockley, R.W., Dodson, G., and Webb, M.R. (1997). The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue. *Nat Struct Biol JID* - 9421566 4, 147-152.
- Jancarik, J. und Kim, S. H. (1991) Sparse-Matrix Sampling - A Screening Method for Crystallization of Proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 409-411.
- Jans, D.A. and Jans, P. (1994). Negative charge at the casein kinase II site flanking the nuclear localization signal of the SV40 large T-antigen is mechanistically important for enhanced nuclear import. *Oncogene JID* - 8711562 9, 2961-2968.
- Jans, D.A. (1995). The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem J JID* - 2984726R 311 ( Pt 3), 705-716.
- Jans, D.A., Moll, T., Nasmyth, K., and Jans, P. (1995). Cyclin-dependent kinase site-regulated signal-dependent nuclear localization of the SW15 yeast transcription factor in mammalian cells. *J Biol Chem JID* - 2985121R 270, 17064-17067.
- John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A., and Goody, R.S. (1990). Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry JID* - 0370623 29, 6058-6065.
- John, J., Rensland, H., Schlichting, I., Vetter, I., Borasio, G.D., Goody, R.S., and Wittinghofer, A. (1993). Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J Biol Chem JID* - 2985121R 268, 923-929.
- Johnson, D.R., Bhatnagar, R.S., Knoll, L.J., and Gordon, J.I. (1994). Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu Rev Biochem JID* - 2985150R 63, 869-914.
- Joseph, J., Tan, S.H., Karpova, T.S., McNally, J.G., and Dasso, M. (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol JID* - 0375356 156, 595-602.

- Kalab, P., Pu, R.T., and Dasso, M. (1999). The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol JID* - 9107782 9, 481-484.
- Kalab, P., Weis, K., and Heald, R. (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science JID* - 0404511 295, 2452-2456.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., and Kawashima, H. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science JID* - 0404511 270, 1491-1494.
- Kehlenbach, R.H. and Gerace, L. (2000). Phosphorylation of the nuclear transport machinery down-regulates nuclear protein import in vitro. *J Biol Chem JID* - 2985121R 275, 17848-17856.
- Klebe, C., Nishimoto, T., and Wittinghofer, F. (1993). Functional expression in *Escherichia coli* of the mitotic regulator proteins p24ran and p45rcc1 and fluorescence measurements of their interaction. *Biochemistry* 32, 11923-11928.
- Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A., and Goody, R.S. (1995). The kinetic mechanism of ran - nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry* 34, 12543-12552.
- Kornbluth, S., Dasso, M., and Newport, J. (1994). Evidence for a dual role for TC4 protein in regulating nuclear structure and cell cycle progression. *J Cell Biol JID* - 0375356 125, 705-719.
- Kosova, B., Pante, N., Rollenhagen, C., Podtelejnikov, A., Mann, M., Aeby, U., and Hurt, E. (2000). Mlp2p, a component of nuclear pore attached intranuclear filaments, associates with nic96p. *J Biol Chem JID* - 2985121R 275, 343-350.
- Krämer, A. U. (2001) Untersuchungen zur Interaktion von humanem Ras und Rap mit regulatorischen Proteinen. Dissertation, Universität Bochum.
- Kuhlmann, J., Macara, I., and Wittinghofer, A. (1997). DYNAMIC AND EQUILIBRIUM STUDIES ON THE INTERACTION OF RAN WITH ITS EFFECTOR, RANBP1. *Biochemistry* 36, 12027-12035.
- Kunkel, T. A. (1985) Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 488-492.
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., and Gorlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell JID* - 0413066 90, 1061-1071.
- la Cour, T.F., Nyborg, J., Thirup, S., and Clark, B.F. (1985). Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. *EMBO J JID* - 8208664 4, 2385-2388.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lam, M.H.C., Briggs, L.J., Hu, W., Martin, T.J., Gillespie, M.T., and Jans, D.A. (1999). Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J.Biol.Chem.* 274, 7391-7398.
- Lanford, R.E. and Butel, J.S. (1984). Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell JID* - 0413066 37, 801-813.
- Lenzen, C., Cool, R.H., Prinz, H., Kuhlmann, J., and Wittinghofer, A. (1998). Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry JID* - 0370623 37, 7420-7430.
- Lenzen, C., Cool, R. H. und Wittinghofer, A. (1995) Analysis of intrinsic and CDC25-stimulated guanine nucleotide exchange of p21ras-nucleotide complexes by fluorescence measurements. *Methods Enzymol.* 255, 95-109.
- Leonetti, J.P., Degols, G., and Lebleu, B. (1990). Biological activity of oligonucleotide-poly(L-lysine) conjugates: mechanism of cell uptake. *Bioconjug Chem JID* - 9010319 1, 149-153.
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg ISBN 3, 8274-0041-4.
- Mackay, D.J. and Hall, A. (1998). Rho GTPases. *J Biol Chem JID* - 2985121R 273, 20685-20688.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell JID* - 0413066 88, 97-107.
- Matsumoto, T. and Beach, D. (1991). Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell JID* - 0413066 66, 347-360.
- Matunis, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol JID* - 0375356 135, 1457-1470.
- Matunis, M.J., Wu, J., and Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol JID* - 0375356 140, 499-509.
- Melchior, F., Guan, T., Yokoyama, N., Nishimoto, T., and Gerace, L. (1995). GTP hydrolysis by Ran occurs at the nuclear pore complex in an early step of protein import. *J Cell Biol JID* - 0375356 131, 571-581.
- Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol JID* - 9600627 16, 591-626.
- Melchior, F. (2001). Ran GTPase cycle: oOne mechanism -- two functions. *Curr Biol JID* - 9107782 11, R257-R260

- Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Kim, S.H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* JID - 0404511 247, 939-945.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.
- Montoya, G., Svensson, C., Lührink, J., and Sinning, I. (1997). Crystal structure of the NG domain from the signal-recognition particle receptor FtsY. *Nature* JID - 0410462 385, 365-368.
- Moore, M.S. and Blobel, G. (1992). The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* JID - 0413066 69, 939-950.
- Moore, M.S. and Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 365, 661-663.
- Moore, M.S. and Blobel, G. (1995). Soluble factors required for nuclear protein import. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* JID - 1256107 60, 701-705.
- Moore, M.S. (1998). Ran and nuclear transport. [Review] [71 refs]. *J.Biol.Chem.* 273, 22857-22860.
- Moore, M.S. (1998). Ran and nuclear transport. *J Biol Chem* JID - 2985121R 273, 22857-22860.
- Moore, W., Zhang, C., and Clarke, P. (2002). Targeting of RCC1 to Chromosomes Is Required for Proper Mitotic Spindle Assembly in Human Cells. *Curr Biol* JID - 9107782 12, 1442
- Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., and Divita, G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* JID - 0411011 25, 2730-2736.
- Muegge, I., Schweins, T., Langen, R., and Warshel, A. (1996). Electrostatic control of GTP and GDP binding in the oncoprotein p21ras. *Structure* JID - 9418985 4, 475-489.
- Murray, D., Hermida-Matsumoto, L., Buser, C.A., Tsang, J., Sigal, C.T., Ben-Tal, N., Honig, B., Resh, M.D., and McLaughlin, S. (1998). Electrostatics and the membrane association of Src: theory and experiment. *Biochemistry* JID - 0370623 37, 2145-2159.
- Nachury, M.V., Ryder, U.W., Lamond, A.I., and Weis, K. (1998). CLONING AND CHARACTERIZATION OF HSRP1-GAMMA, A TISSUE-SPECIFIC NUCLEAR TRANSPORT FACTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 582-587.
- Navaza, J. (2001). Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* JID - 9305878 57, 1367-1372.

- Nemergut, M.E. and Macara, I.G. (2000). Nuclear import of the ran exchange factor, RCC1, is mediated by at least two distinct mechanisms. *Journal of Cell Biology* 149, 835-850.
- Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D., and Macara, I.G. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* JID - 0404511 292, 1540-1543.
- Newmeyer, D.D., Lucocq, J.M., Burglin, T.R., and De Robertis, E.M. (1986). Assembly in vitro of nuclei active in nuclear protein transport: ATP is required for nucleoplasmin accumulation. *EMBO J* JID - 8208664 5, 501-510.
- Newmeyer, D.D. and Forbes, D.J. (1988). Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell* JID - 0413066 52, 641-653.
- Nieba, L., Krebber, A., and Pluckthun, A. (1996). Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* JID - 0370535 234, 155-165.
- Nilsson, J., Weis, K., and Kjems, J. (2002). The C-terminal extension of the small GTPase Ran is essential for defining the GDP-bound form. *J Mol Biol* JID - 2985088R 318, 583-593.
- Noel, J.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP  $\gamma$ S. *Nature* JID - 0410462 366, 654-663.
- Ohba, T., Nakamura, M., Nishitani, H., and Nishimoto, T. (1999). Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science* JID - 0404511 284, 1356-1358.
- Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., Kuma, K., Miyata, T., Fukushige, S., and Murotsu, T. (1987). Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation. *Genes Dev* JID - 8711660 1, 585-593.
- O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., and Peck, K. (1992) Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Analytical Biochemistry* 205, 132-136.
- Ostermeier, C. and Brunger, A.T. (1999). Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* JID - 0413066 96, 363-374.
- Page, M.J., Hall, A., Rhodes, S., Skinner, R.H., Murphy, V., Sydenham, M., and Lowe, P.N. (1989). Expression and characterization of the Ha-ras p21 protein produced at high levels in the insect/baculovirus system. *J Biol Chem* JID - 2985121R 264, 19147-19154.
- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W., and Wittinghofer, A. (1990). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J* JID - 8208664 9, 2351-2359.

- Paine, P.L., Moore, L.C., and Horowitz, S.B. (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature* JID - 0410462 254, 109-114.
- Paine, S. (1993). Supplies, supplies. *Health Serv J* JID - 8605800 103, 32-aïne, S.
- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (2000). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* JID - 0410462 403, 567-571.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L.J., Jarnik, M., Engel, A., and Aeby, U. (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* JID - 0375356 110, 883-894.
- Ren, M., Drivas, G., D'Eustachio, P., and Rush, M.G. (1993). Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *J Cell Biol* JID - 0375356 120, 313-323.
- Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M., and Wittinghofer (1998). The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature*, vol 392, no.6671, 5 March 1998, pp.97-101. *Publisher*, Macmillan
- Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A., and Wittinghofer, A. (2001). Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell* JID - 0413066 105, 245-255.
- Rensland, H., Lautwein, A., Wittinghofer, A., and Goody, R.S. (1991). Is there a rate-limiting step before GTP cleavage by H-ras p21? *Biochemistry* JID - 0370623 30, 11181-11185.
- Rensland, H., John, J., Linke, R., Simon, I., Schlichting, I., Wittinghofer, A., and Goody, R.S. (1995). Substrate and product structural requirements for binding of nucleotides to H-ras p21: the mechanism of discrimination between guanosine and adenosine nucleotides. *Biochemistry* JID - 0370623 34, 593-599.
- Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* JID - 0217513 1451, 1-16.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H.M., Stewart, M., and Gorlich, D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO Journal* 17, 6587-6598.
- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E., and Gorlich, D. (1999). The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr Biol* JID - 9107782 9, 47-50.
- Ribbeck, K. and Gorlich, D. (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J* JID - 8208664 20, 1320-1330.
- Richards, S.A., Lounsbury, K.M., and Macara, I.G. (1995). The C terminus of the nuclear RAN/TC4 GTPase stabilizes the GDP-bound state and mediates interactions with RCC1, RAN-GAP, and HTF9A/RANBP1. *J Biol Chem* JID - 2985121R 270, 14405-14411.



- Richardson, W.D., Mills, A.D., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., and Dingwall, C. (1988). Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores. *Cell JID* - 0413066 52, 655-664.
- Rihs, H.P. and Peters, R. (1989). Nuclear transport kinetics depend on phosphorylation-site-containing sequences flanking the karyophilic signal of the Simian virus 40 T-antigen. *EMBO J JID* - 8208664 8, 1479-1484.
- Rihs, H.P., Jans, D.A., Fan, H., and Peters, R. (1991). The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J JID* - 8208664 10, 633-639.
- Rout, M.P. and Blobel, G. (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol JID* - 0375356 123, 771-783.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B.T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol JID* - 0375356 148, 635-651.
- Rout, M.P. and Aitchison, J.D. (2001). The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem JID* - 2985121R 276, 16593-16596.
- Ryan, K.J. and Wentz, S.R. (2000). The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol JID* - 8913428 12, 361-371.
- Sanger, F. und Coulson, A. R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94, 441-448.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci JID* - 7610674 15, 430-434.
- Sazer, S. and Nurse, P. (1994). A fission yeast RCC1-related protein is required for the mitosis to interphase transition. *EMBO J JID* - 8208664 13, 606-615.
- Schaff, J.C., Slepchenko, B.M., and Loew, L.M. (2000). Physiological modeling with virtual cell framework. *Methods Enzymol JID* - 0212271 321, 1-23.
- Scheffzek, K., Kabsch, W., Schlichting, I., Pai, E.F., Lautwein, A., Frech, M., Wittinghofer, A., and Goody, R.S. (1994). Crystallization and preliminary X-ray structure analysis of thermally unstable p21/sup H-ras/ guanosine complexes. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, vol D50, pt.4, 1 July 1994, pp.521-6. Denmark.,
- Scheffzek, K., Klebe, C., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., and Wittinghofer, A. (1995). Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature*, vol 374, no.6520, 23 March 1995, pp.378-81. UK.,
- Schimmoller, F., Simon, I., and Pfeffer, S.R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem JID* - 2985121R 273, 22161-22164.

- Schroeder, H., Leventis, R., Shahinian, S., Walton, P.A., and Silviu, J.R. (1996). Lipid-modified, cysteinyl-containing peptides of diverse structures are efficiently S-acylated at the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* JID - 0375356 134, 647-660.
- Schwoebel, E.D., Talcott, B., Cushman, I., and Moore, M.S. (1998). Ran-dependent signal-mediated nuclear import does not require GTP hydrolysis by Ran. *J Biol Chem* JID - 2985121R 273, 35170-35175.
- Seino, H., Hisamoto, N., Uzawa, S., Sekiguchi, T., and Nishimoto, T. (1992). DNA-binding domain of RCC1 protein is not essential for coupling mitosis with DNA replication. *J Cell Sci* JID - 0052457 102 ( Pt 3), 393-400.
- Sheldon, K., Liu, D., Ferguson, J., and Garipey, J. (1995). Loligomers: design of de novo peptide-based intracellular vehicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* JID - 7505876 92, 2056-2060.
- Smith, A.E., Slepchenko, B.M., Schaff, J.C., Loew, L.M., and Macara, I.G. (2002). Systems analysis of Ran transport. *Science* 295, 488-491.
- Steggerda, S.M. and Paschal, B.M. (2000). The mammalian Mog1 protein is a guanine nucleotide release factor for Ran. *J.Biol.Chem.* 275, 23175-23180.
- Stewart, M., Baker, R.P., Bayliss, R., Clayton, L., Grant, R.P., Littlewood, T., and Matsuura, Y. (2001). Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett* JID - 0155157 498, 145-149.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B., and Aebi, U. (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* JID - 8913428 11, 391-401.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* JID - 0212271 185, 60-89.
- Szabo, A., Stolz, L., and Granzow, R. (1995) Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Current Opinion in Structural Biology* 5, 699-705.
- Tagawa, T., Kuroki, T., Vogt, P.K., and Chida, K. (1995). THE CELL CYCLE-DEPENDENT NUCLEAR IMPORT OF V-JUN IS REGULATED BY PHOSPHORYLATION OF A SERINE ADJACENT TO THE NUCLEAR LOCALIZATION SIGNAL. *Journal of Cell Biology* 130, 255-263.
- Tagawa, T., Kuroki, T., Vogt, P.K., and Chida, K. (1995). The cell cycle-dependent nuclear import of v-Jun is regulated by phosphorylation of a serine adjacent to the nuclear localization signal. *J Cell Biol* JID - 0375356 130, 255-263.
- Tucker, J., Sczakiel, G., Feuerstein, J., John, J., Goody, R. S. und Wittinghofer, A. (1986) Expression of P21 Proteins in Escherichia-Coli and Stereochemistry of the Nucleotide-Binding Site. *EMBO J.* 5, 1351-1358.

- Van Etten, R.A., Jackson, P., and Baltimore, D. (1989). The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* JID - 0413066 58, 669-678.
- Vasu, S.K. and Forbes, D.J. (2001). Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* JID - 8913428 13, 363-375.
- Vetter, I.R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J., and Wittinghofer, A. (1999). Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature*, vol 398, 6722, 39-46
- Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001). Signal transduction - The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions [Review]. *Science* 294, 1299-1304.
- Voet, D., Gratzer, W. B., Cox, R. A. und Doty, P. (1963) Absorption spectra of nucleotides, polynucleotides, and nucleic acids in the far ultraviolet. *Biopolymers* 1, 193-208.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P., and Derewenda, Z.S. (1997). Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat Struct Biol* JID - 9421566 4, 699-703.
- Weis, K., Ryder, U., and Lamond, A.I. (1996). The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J* JID - 8208664 15, 1818-1825.
- Wen, S.T., Jackson, P.K., Vanetten, R.A., Abelson, m.l.v., Retino-blastoma, p., and Tyrosine, k. (1996). THE CYTOSTATIC FUNCTION OF C-ABL IS CONTROLLED BY MULTIPLE NUCLEAR LOCALIZATION SIGNALS AND REQUIRES THE P53 AND RB TUMOR SUPPRESSOR GENE PRODUCTS. *EMBO Journal* 15, 1583-1595.
- Wilde, A. and Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* JID - 0404511 284, 1359-1362.
- Wittinghofer, A., Effectors, Gtpase, Gtpase-activating, p., and Oncogene, r. (1998). SIGNAL TRANSDUCTION VIA RAS. *Biological Chemistry* 379, 933-937.
- Worthylake, D.K., Rossman, K.L., and Sondek, J. (2000). Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* JID - 0410462 408, 682-688.
- Yamada, M., Tachibana, T., Imamoto, N., and Yoneda, Y. (1998). Nuclear transport factor p10/NTF2 functions as a Ran-GDP dissociation inhibitor (Ran-GDI). *Curr Biol* JID - 9107782 8, 1339-1342.
- Yan, C., Leibowitz, N., and Melese, T. (1997). A role for the divergent actin gene, ACT2, in nuclear pore structure and function. *EMBO J* JID - 8208664 16, 3572-3586.
- Yang, Q., Rout, M.P., and Akey, C.W. (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell* JID - 9802571 1, 223-234.

- Zhang, C. and Clarke, P.R. (2000). Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in *Xenopus* egg extracts. *Science* 288, 1429-1432.

## 7 ANHANG

### 7.1 Eigene Veröffentlichungen

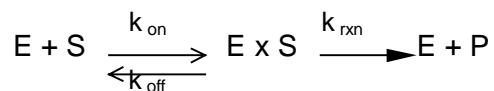
**Renault L., Kuhlmann J., Henkel A., und Wittinghofer A. (2001)** Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of Chromosome Condensation (RCC1). *Cell* **105**: 245-255.

### 7.2 Herleitungen

#### 7.2.1 Michaelis-Menten-Kinetik

##### Michaelis-Menten-Formalismus

Michaelis und Menten (1913) entwickelten folgenden Formalismus zur Beschreibung einfacher, enzymatischer Reaktionen (siehe auch Briggs und Haldane, 1925):



Gleichung 35

E	Enzym, z. B. RanGAP
S	Substrat, z. B. Ran-GTP
E·S	Enzym-Substrat-Komplex
P	Produkt, z. B. Ran-GDP
$k_{\text{on}}$	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
$k_{\text{off}}$	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
$k_{\text{rxn}}$	Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion, z. B. Hydrolyse

Der Reaktionsmechanismus nach Michaelis und Menten gliedert sich in zwei Schritte, einen reversiblen Bindungsschritt, der durch  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  charakterisiert wird, und einen irreversiblen Reaktionsschritt, der durch  $k_{\text{rxn}}$  charakterisiert wird. In diesem einfachen Fall entspricht  $k_{\text{rxn}}$  der maximalen Reaktionsrate  $k_{\text{cat}}$  unter Sättigungsbedingungen.

### Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung

Die Geschwindigkeit  $V$ , mit der das Produkt gebildet wird, ist demnach:

$$V = k_{cat} [E \cdot S]$$

Gleichung 36

Betrachtet man die Reaktion im chemischen Gleichgewicht, d. h. bei konstanter Konzentration  $[E \cdot S]$ , so muss gelten, dass die Geschwindigkeiten, mit denen  $E \cdot S$  gebildet und verbraucht wird, einander entsprechen (Quasi-Stationaritätsprinzip nach Bodenstein und Dux, 1913):

$$d[E \cdot S]/dt = 0 = k_{on} [E] [S] = (k_{off} + k_{cat}) [E \cdot S]$$

Gleichung 37

Die Umformung ergibt:

$$[E \cdot S] = \frac{[E][S]}{(k_{off} + k_{cat})/k_{on}} = \frac{[E][S]}{K_M}$$

Gleichung 38

$K_M$       Michaelis-Konstante

Die Enzymkonzentration im Gleichgewicht entspricht der Gesamtkonzentration abzüglich der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes:

$$[E] = [E_0] - [E \cdot S]$$

Gleichung 39

Nach Einsetzen in Gleichung 38 und Auflösen nach  $[E \cdot S]$  folgt:

$$[E \cdot S] = [E_0] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Gleichung 40

Einsetzen in Gleichung 36 ergibt:

$$V = k_{cat} [E_0] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Gleichung 41

Ist das Enzym mit Substrat gesättigt ( $[S] \gg K_M$ ), wird  $V$  maximal und entspricht  $k_{cat} [E_0]$ . Substituiert man diesen Term durch  $V_{max}$ , erhält man die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$V([S]) = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Gleichung 42

$V_{max}$       maximale Reaktionsgeschwindigkeit für  $[S] \gg K_M$

### Experimentelle Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter

Unter Bedingungen, bei denen die Substratkonzentration deutlich unter der Michaelis-Konstante  $K_M$  liegt ( $[S] \ll K_M$ ), ist die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional der Substratkonzentration. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter einer enzymatischen Reaktion werden üblicherweise die Anfangsgeschwindigkeiten gemessen, so dass die Substratkonzentration über  $[S] \approx [S_0]$  angenähert werden kann. Die Auftragung der Reaktionsraten  $V([S])$  gegen die Substratkonzentrationen  $[S]$  und die nicht-lineare Angleichung von Gleichung 42 ermöglichen es,  $k_{cat}$  und  $K_M$  zu erhalten.

## 7.3 Abkürzungen

DTE	1,4-Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP, GTP	Guanosin-5'-diphosphat, Guanosin-5'-triphosphat

GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GNBP	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GppNHp	Guanosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)-triphosphat
GTPase	GTP-hydrolysierendes Enzym
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IAEDANS	5-(((2-iodoacetyl) amino) ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
$K_D$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
$k_{cat}$	Geschwindigkeitskonstante nach Michaelis-Menten
$K_M$	Michaeliskonstante
mant-	Methylantraniloyl-
NES	Nukleäre Exportsequenz
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
NPC	nuclear pore complex
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PEG #	Polyethylenglycol mit einem mittleren Molekulargewicht von # Da
P <sub>i</sub>	Orthophosphat
P-Schleife	Phosphat-Schleife eines GNBP
Ran	Ras-ähnlich, nukleosolisch
<sup>R</sup> (E70 <sup>R</sup> )	hochgestelltes <sup>R</sup> bezeichnet eine Aminosäure von Ran
RanBD, RanBP	Ran-bindende Domäne, Ran-bindendes Protein
RanGAP	GTPase-aktivierendes Protein für Ran
Ras	Ratten-Sarkom Protein
RBD	Ras-bindende Domäne
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>SUMO-1</i>	small ubiquitin-like modifier
<i>SUMO-AD</i>	SUMO attachment domain
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Für die Aminosäuren wurde der Ein- und Dreibuchstabencode verwendet :

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Aspartat	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutamat	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin	x		beliebig



# DANKSAGUNG

Nun möchte ich mich bei allen bedanken, die mir durch ihre Unterstützung in den letzten drei Jahren die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und erleichtert haben:

Prof. Dr. Alfred Wittinghofer danke ich für die Aufnahme in seine Abteilung, die interessanten Forschungsthemen und für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung der Arbeit an der Philipps-Universität in Marburg.

Bei Prof. Dr. Alfred Batschauer und Prof. Dr. Michael Bölker bedanke ich mich ganz herzlich für die Bereitschaft bei meiner Disputation als Prüfer tätig zu sein.

Prof. Dr. Jürgen Kuhlmann möchte ich für die sehr gute Betreuung, die ständige Gesprächsbereitschaft besonders in Fragen der Biophysik danken. Ohne die vielen Diskussionen und die gewährten Freiräume, die es mir erlaubten eigene Ideen zu verfolgen und umzusetzen, läge die Arbeit heute nicht in dieser Form vor.

Dr. Louis Renault für die Einführung in die Geheimnisse der Kristallographie.

Christine Nowak für ihre sehr gute Laborführung und technische Unterstützung. Im gleichen Sinne auch Carolin Körner, Doro Kühlmann, Andrea Gerhards.

Alex B., Alex W., Borianna, Christian, Christine, Holger, Jens, Martin, Melanie, Michael, Nadine, Olli, Rolf, Slava und Steffie danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die daraus sehr oft hervorgegangene konstruktiver Kritik, wie auch für gute Zusammenarbeit und Stimmung in- und außerhalb des Labors. Ebenso der ganzen Abteilung Strukturelle Biologie.

Ich danke meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mich stets in so sehr vielen Dingen unterstützt haben.

Meinen Freunden Thorsten und Tamara

... und Dir liebe Kathy, für so viel!



# ERKLÄHRUNG

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

## **Strukturelle und biochemische Untersuchungen zu Ran und seinem Nukleotidaustauschfaktor RCC1**

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl (naturwissenschaftlicher Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg) in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und bei der Abfassung der Arbeit keiner anderen als die in dieser Dissertation angeführten Hilfsmittel bedient habe.

Die vorliegende Dissertation wurde bisher nicht an einer in- und ausländischen Hochschule in der jetzigen oder einer ähnlichen Form eingereicht und hat keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Dortmund, den